

„Dovoľujem zapožičanie svojej diplomovej práce k študijným účelom a prosím, aby bola vedená presná evidencia výpožičiek. Prevzaté údaje je vypožičiavateľ povinný riadne ocitovať.“

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní odbor: Mikrobiologie



Bc. Jakub Lenart

Vliv aminokyselinové variability na rezistenční fenotyp u ARE podrodiny
ABC proteinů

The effect of aminoacid variability on the resistance phenotype
in ARE subfamily of ABC proteins

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: Mgr. Gabriela Novotná, Ph.D.

Praha 2012

Prehlásenie:

Prehlasujem, že som záverečnú prácu vypracoval samostatne len s použitím citovanej literatúry. Táto práca ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného titulu.

V Prahe 15.8.2012

Podpis.....

Týmto by som chcel poďakovať mojej školiteľke Mgr. Gabriele Novotnej, Ph.D. a Mgr. Lucii Najmanovej, Ph.D., za odbornú pomoc, cenné rady, pripomienky a ústretový prístup pri vedení tejto práce. Taktiež ďakujem celému kolektívu Laboratória sekundárneho metabolizmu Mikrobiologického ústavu AV ČR – Jirkovi, Tomášovi, Bojane, Eliške, Jane, Dane, Tomovi, Aničke, Lenke, Petre, Markéte, Standovi, Eve a ďalším za ich rady a za príjemnú atmosféru. Poďakovanie patrí aj mojej rodine, že ma podporovali a umožnili mi dosiahnutie kvalitného vzdelania. Taktiež aj kamarátom, že mali so mnou pochopenie.

Táto práca bola vypracovaná v Laboratóriu sekundárneho metabolizmu Mikrobiologického ústavu AV ČR, v rokoch 2010-2012 v rámci grantového projektu Ministerstva školstva mládeže a telovýchovy (1M06011).

Abstrakt

ARE podrodina proteínov patriaca k ABC transportérom udeľuje rezistenciu k makrolidovým, linkozamidovým a streptogramínovým antibiotikám. Medzi klinicky najvýznamnejšie proteíny ARE podrodiny u stafylokokov patrí Vga(A) proteín udeľujúci rezistenciu k streptogramínom A. V roku 2006 bola objavená jeho nová varianta označovaná ako Vga(A)_{LC}, ktorá okrem streptogramínom A udeľuje taktiež rezistenciu k linkozamidom. Vga(A) a Vga(A)_{LC} sa líši iba v 7 aminokyselinách, napriek tomu udeľuje odlišný rezistenčný fenotyp. V predchádzajúcich experimentoch sa zistilo, že centrálnu rolu v určení substrátovej špecificity hrajú 4 aminokyselinové rozdiely, ktoré sú nahlúčené v úseku 15 aminokyselín vnútri linkeru spájajúceho dve ABC domény (pozícia 212, 219, 220 a 226). Kombinácia aminokyselín LGAG z Vga(A) zvyšuje rezistenciu k streptogramínom A, zatiaľ čo kombinácia SVTS prítomná vo Vga(A)_{LC} zvyšuje rezistenciu k linkozamidom. Napriek tomu do tejto rodiny patrí množstvo rezistenčných proteínov, mechanizmus rezistencie nebol doposiaľ s istotou dokázaný.

Cieľom práce bolo vytvorenie nových Vga(A) variant, ktoré obsahujú kombinácie aminokyselín špecifických pre Vga(A) a Vga(A)_{LC} proteín v pozíciách 212, 219, 220 a 226 a porovnanie ich schopnosti udeľovať rezistenciu k linkozamidom. Taktiež sme skúmali vplyv mutácií v tejto variabilnej časti linkeru, ktoré sa vyskytujú v nových variantach Vga(A), ktorých sekvencie sú dostupné v databáze GenBank. Zo 14 možných kombinácií aminokyselín špecifických pre Vga(A) a Vga(A)_{LC} sa nám podarilo pripraviť 8 z nich 6 (SGTG, SVTG, LGTS, SGTS, SVAS a LVTS) udeľovalo podobnú rezistenciu ako Vga(A)_{LC}. Mutované proteíny nesúce tieto kombinácie aminokyselín udeľovali vyššiu rezistenciu k linkozamidom než ku streptogramínom A. Okrem toho iba jediná mutácia K218T, v proteíne Vga(A) bola zodpovedná za zmenu fenotypu z Vga(A) na Vga(A)_{LC}. Zdá sa, že Vga(A) proteíny všeobecne uprednostňujú linkozamidy pred streptogramínmi A, čo by malo byť bránené v úvahu pri posudzovaní rezistencie v klinickej praxi. Súčasťou tejto diplomovej práce bola taktiež príprava fúzných Vga(A) proteínov, ktoré by umožňovali imunodetekciu Vga(A) v bunkových frakciách. Inkorporáciou HIS alebo FLAG kotvy však dochádza k pravdepodobnej inaktivácii Vga(A) proteínu.

Kľúčové slová: ABC transportéry, ARE proteíny, Vga(A), Vga(A)_{LC}, linkozamidy, streptogramíny A, *Staphylococcus aureus*

Abstract

Proteins of ARE subfamily of ABC transporters confers resistance in various degree to macrolides, lincosamides and streptogramins. Among the most clinically important ARE proteins is Vga(A) conferring resistance to streptogramins A in staphylococci. A new variant of Vga(A), called Vga(A)_{LC}, conferring resistance to lincosamides in addition to streptogramins A was discovered in 2006. Although Vga(A) and Vga(A)_{LC} differ only in 7 amino acid residues, they confer different resistance phenotypes. In previous experiments it has been shown that the central role in determining the substrate specificity is played by 4 amino acid residues. These residues are accumulated in the section of only 15 amino acids residues located within the linker connecting the two ABC domains (positions 212, 219, 220 and 226). The amino acid residues combination LGAG which is specific for Vga(A) increased resistance to streptogramins A while the combination SVTS from Vga(A)_{LC} increased the resistance to lincosamides. The mechanism of resistance has not yet been explained with certainty.

The aim of this study was to create a new Vga(A) variants combining amino acids residues specific for Vga(A) and Vga(A)_{LC} proteins in positions 212, 219, 220 and 226 and to compare their ability to confer resistance to lincosamides. We also studied the effect of mutations in the same variable linker, which occurs in the new Vga(A) variants whose sequences are available in the GenBank database. From the 14 possible combinations of amino acid residues specific for Vga(A) and Vga(A)_{LC}, we have managed to prepare eight. From that, six combinations (SGTG, SVTG, LGTS, SGTS, SVAS, LVTS) led to a similar resistance phenotype as for Vga(A)_{LC}. Mutated proteins carrying these combinations of amino acid residues conferred higher resistance to lincosamides than to streptogramins A. In addition, only one mutation K218T in protein Vga(A) was responsible for the change of the phenotype from Vga(A) to Vga(A)_{LC}. It seems, therefore, that Vga(A) proteins generally prefer lincosamides before streptogramins A, which should be taken into account when assessing resistance in clinical practice. As part of this thesis Vga(A) proteins fused with protein tags were also prepared in order to enable immunodetection of Vga(A) in cell fractions. However, incorporation of FLAG-tag or HIS-tag is likely to inactivate the Vga(A) protein.

Key words: ABC transporters, ARE proteins, Vga(A), Vga(A)_{LC}, lincosamides, streptograminsA, *Staphylococcus aureus*.

Zoznam skratiek

ABC	(ATP-binding cassette) ATP-väzobný proteín
ADP	adenozíndifosfát
A-miesto	aminoacyltransferázové miesto
ARE rodina	(antibiotic resistance) rodina ABC proteínov
aminokyseliny	
A	alanín
D	kyselina asparagová
G	glycín
K	lyzín
L	leucín
Q	Glutamín
S	serín
T	treonín
V	Valín
Y	Tyrozín
	(American Type Culture Collection) Americká zbierka
ATCC	mikroorganizmov
ATP	adenozíntrifosfát
bp	(base pair) báзовé páry
CLI	klindamycín
cMLSB	konštitutívna MLSB rezistencia
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EF-1	elongačný faktor 1
EF-3	elongačný faktor 3
eIF2	eukaryotický iniciačný faktor 1
E-miesto	exit (výstupné) miesto
ERY	Erytromycín
iMLSB	inducibilná MLSB rezistencia
LIN	linkomycín
MIC	minimálna inhibičná koncentrácia
MLSB	rezistencia na makrolidy, linkozamidy a streptogramíny B

mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MRSA	metecilín rezistentný <i>Staphylococcus aureus</i>
NBD	(nucleotide binding domains) nukleotid-viažúca doména
OD	optická denzita
oligonukleotidy	
A	adenín
C	cytozín
G	guanín
T	tymín
ORF	(open reading frame) otvorený čítací rámeček
P	fosfát
PBP	penicilín viažuci proteín
PCR	(polymerase chain reaction) polymerázová reťazová reakcia
PIIA	pristinamycín IIA
P-miesto	peptidyltransferázové miesto
RPM	(revolutions per minute) otáčky za minútu
rRNA	ribozomálna ribonukleová kyselina
TMD	(transmembrane domain) transmembránová doména
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
TSST-1	(toxic shock syndrome toxin 1) syndróm toxického šoku
VRSA	vankomycín rezistentný <i>Staphylococcus aureus</i>

Obsah

1. ÚVOD	13
2. LITERÁRNY PREHĽAD	15
2.1. ABC PROTEÍNY	15
2.1.1. ŠTRUKTÚRA KONZERVOVANÝCH DOMÉN ABC TRANSPORTÉROV	15
2.1.2. MECHANIZMUS TRANSPORTU	18
2.1.3. FYLOGENETICKÉ ČLENENIE ABC PROTEÍNOV	18
2.1.4. DRUHÁ TRIEDA ABC PROTEÍNOV	18
2.1.4.1. UVR rodina	19
2.1.4.2. RLI rodina	19
2.1.4.3. ART rodina.....	19
2.1.4.3.1. EF-3 podrodina	20
2.1.4.3.2. REG podrodina	20
2.1.4.3.3. ARE podrodina.....	20
2.1.5. REZISTENCIA SPÔSOBENÁ ARE PROTEÍNMI	21
2.1.5.1. Msr(A) – rezistencia k makrolidom a streptogramínom B.....	21
2.1.5.2. Vga proteíny - rezistencia k streptogramínom A a znížená citlivosť k linkozamidom	22
2.1.5.3. Vga(A)LC - rezistencia k streptogramínom A a k linkozamidom (LS _A fenotyp).....	23
2.1.5.4. Lsa – rezistencia k streptogramínom a linkozamidom	25
2.1.5.5. Lmr(C) proteín	26
2.1.6. DVE HYPOTÉZY MECHANIZMU FUNKCIE ARE PROTEÍNOV	26
2. 2. MAKROLIDY, LINKOZAMIDY A STREPTOGRAMÍNY (MLS ANTIBIOTIKÁ)	28
2.2.1. ŠTRUKTÚRA MAKROLIDOVÝCH, LINKOZAMIDOVÝCH A STREPTOGRAMÍNOVÝCH ANTIBIOTÍK	28
2.2.2. MECHANIZMUS ÚČINKU MAKROLIDOVÝCH, LINKOZAMIDOVÝCH A STREPTOGRAMINOVÝCH ANTIBIOTÍK.....	31
2.2.3. KLINICKÉ VYUŽITIE MAKROLIDOVÝCH, LINKOZAMIDOVÝCH A STREPTOGRAMÍNOVÝCH ANTIBIOTÍK	32
2.3. REZISTENCIA NA MAKROLIDY, LINKOZAMIDY A STREPTOGRAMÍNY	33
2.3.1. REZISTENCIA SPÔSOBENÁ MODIFIKÁCIOU CIEĽOVÉHO MIESTA	33
2.3.1.1. Rezistencia spôsobená Erm metyltransferázou	33
2.3.1.2. Rezistencia spôsobená Cfr metyltransferázou.....	34
2.3.1.3. Modifikácia cieľového miesta spôsobená mutáciami	34
2.3.2. ENZYMATICKÁ INAKTIVÁCIA ANTIBIOTIKA.....	35
2.3.3. REZISTENCIA SPÔSOBENÁ ARE PODRODINOU ABC PROTEÍNOV	36

2.4. BAKTERIÁLNY ROD <i>STAPHYLOCOCCUS</i>	37
2.4.1. HISTÓRIA BAKTERIÁLNEHO RODU	37
2.4.2. MORFOLÓGIA A FYZIOLÓGIA BAKTERIÁLNEHO RODU <i>STAPHYLOCOCCUS</i>	37
2.4.3. <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	38
2.4.4. KOAGULÁZA-NEGATÍVNE STAFYLOKOKY	39
2.4.5. VZŤAH ČLOVEKA K OCHORENIAM VYVOLANÝCH BAKTÉRIOU <i>STAPHYLOCOCCUS SP.</i> A ICH EPIDEMIOLOGIA...40	
2.4.6. REZISTENCIA BAKTERIÁLNEHO RODU <i>STAPHYLOCOCCUS</i>	41
 3. MATERIÁL A METÓDY	42
 3.1. MATERIÁL	42
3.1.1. BAKTERIÁLNE KMENE	42
3.1.2. VEKTORY	43
3.1.3. KULTIVAČNÉ MÉDIA	44
3.1.4. ROZTOKY A PUFRY	46
3.1.5. OLIGONUKLEOTIDY	49
3.1.6. ENZÝMY	50
3.1.7. KOMERČNÉ SÚPRAVY A ŠTANDARDY	51
3.1.8. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	51
3.1.9. SOFTWARE A INTERNETOVÉ APLIKÁCIE	53
3.1.10. PRÍSTROJE A ZARIADENIA	53
3.1.11. POUŽITÉ KONŠTRUKTY	54
3.2. METÓDY	55
3.2.1. KULTIVÁCIA A UCHOVÁVANIE BAKTÉRIÍ	55
3.2.1.1. Kultivácia a uchovávanie <i>Escherichia coli</i>	55
3.2.1.2. Kultivácia a uchovávanie <i>Staphylococcus aureus</i> RN4220	55
3.2.2. PRÍPRAVA A TRANSFORMÁCIA KOMPETENTNÝCH BUNIEK	55
3.2.2.1. Príprava kompetentných buniek <i>E. coli</i> pre transformáciu teplotným šokom	55
3.2.2.1.1. Transformácia kompetentných buniek <i>E. coli</i> teplotným šokom	56
3.2.2.2. Príprava kompetentných buniek <i>S. aureus</i> RN 4220 pre transformáciu elektroporáciou...57	
3.2.2.2.1. Transformácia kompetentných buniek <i>S. aureus</i> RN4220 elektroporáciou	58
3.2.3. PRÍPRAVA KONŠTRUKTOV A CIELENÁ MUTAGENÉZA	58
3.2.3.1. Príprava konštruktov pomocou In-Fusion® HD Cloning Kit	58
3.2.3.2. Cílená mutagenéza pomocou QuikChange™ (Promega)	62
3.2.4. IZOLÁCIA DNA	63

3.2.4.1. Izolácia celkovej DNA zo stafylokokov.....	63
3.2.5. ŠTIEPENIE DNA FRAGMENTOV POMOCOU RESTRIČKÝCH ENDONUKLEÁZ.....	64
3.2.6. LIGÁCIA RESTRIKČNÝCH FRAGMENTOV DNA DO PRB374.....	65
3.2.7. POLYMERAZOVÁ REŤAZOVÁ REAKCIA.....	65
3.2.8. ELEKTROFORÉZA DNA V AGARÓZOVOM GÉLY.....	67
3.2.9. SEKVENOVANIE DNA.....	68
3.2.10. STANOVOVANIE CITLIVOSTI NA ANTIMIKRÓBNE LÁTKY	68
3.2.10.1. Príprava inokula.....	68
3.2.10.2. Disková difúzna metóda	69
3.2.10.3. Agarová dilúčna metóda.....	71
4. VÝSLEDKY	73
4.1. POROVNANIE VPLYVU AMINOKYSELINOVEJ VARIABILITY Vga(A) A Vga(A)_{LC} NA SCHOPNOSŤ UDELOVAŤ REZISTENCIU K LINKOZAMIDOM	73
4.1.1. PRÍPRAVA KONŠTRUKTOV EXPRIMUJÚCICH Vga(A) MUTANTY A ICH TRANSFORMÁCIA DO CITLIVÉHO KMEŇA <i>S. AUREUS</i> RN4220	74
4.1.2. TESTOVANIE CITLIVOSTI K LINKOZAMIDOM A STREPTOGRAMÍNOM	80
4.1.2.1. Stanovenie citlivosti kmeňov exprimujúcich novo pripravené mutantné formy proteínov Vga(A) a Vga(A) _{LC}	83
4.2. POROVNANIE REZISTENČNÉHO FENOTYPU NOVÝCH Vga(A) VARIANT	85
4.2.1. PRÍPRAVA KONŠTRUKTU POMOCOU IN-FUSION® HD CLONING KIT	86
4.2.2. CITLIVOSŤ NOVÝCH Vga(A) VARIANT K STREPTOGRAMÍNOM A LIKOZAMIDOM.....	88
4.3. PRÍPRAVA KONŠTRUKTU EXPRIMUJÚCI FUNKČNÝ PROTEÍN Vga(A) UMOŽŇUJÚCI OVERENIE BUNKOVEJ LOKALIZÁCIE POMOCOU IMUNODETEKCIE.....	90
5. DISKUSIA	94
6. SÚHRN.....	101
7. LITERATÚRA.....	103

1. Úvod

Antibiotiká patria medzi antiinfekčné látky používané v liečbe infekčných ochorení bakteriálneho pôvodu. V druhej polovici 20. storočia, kedy sa začalo využívanie antiinfekčných liečiv v medicíne, dramaticky poklesli ochorenia a úmrtia, ktoré spôsobovali baktérie. Avšak v prvých rokoch po zavedení antimikróbných liečiv do klinickej praxe si začali baktérie vyvíjať rôzne mechanizmy rezistencie, ktoré im umožňujú prežívať aj v prítomnosti antibiotík. Hlavným centrom šírenia rezistencie sú nemocničné zariadenia.

„Keď Sir Alexander Fleming v roku 1928 objavil penicilín, svitla ľuďstvu nová nádej, že bude možné liečiť všetky bakteriálne ochorenia. Avšak objavením penicilínu sa začali objavovať aj prvé rezistencie. Pochopiť mechanizmus rezistencie na antibiotiká nám umožní prípravu nových antimikróbných liečiv v boji proti infekčným ochoreniam. Avšak každý takýto boj vyhráme len čiastočne, pretože do dnešného dňa sa nepodarilo vyvinúť antimikróbnu látku, na ktorú by si baktéria nedokázala časom vyvinúť rezistenčný mechanizmus. Je to akýsi začarovaný kruh.“

Do dnešného dňa nie je veľmi pochopený mechanizmus rezistencie na makrolidové, linkozamidové a streptogramínové antibiotiká udeľované rezistenčnými proteínmi ARE podrodiny. Aj keď sú tieto antibiotiká štruktúrne odlišné, mechanizmus účinku majú veľmi podobný. Viasu sa na 50S podjednotku bakteriálneho ribozómu a tým inhibujú proteosyntézu. ARE proteíny patria medzi ABC transportéry. Doposiaľ boli vyslovené dve hypotézy o mechanizme rezistencie, ktorý udeľujú tieto proteíny. Prvá hypotéza predpokladá aktívny export antibiotika z bakteriálnej bunky, avšak tieto proteíny nemajú transmembránovú doménu, ktorá by zaisťovala prenos antibiotík cez membránu. Preto bola navrhnutá druhá hypotéza, ktorá predpokladá, že proteín ovplyvňuje väzbu antibiotika do svojho zásahového miesta na 50S podjednotke ribozómu. Tomu nasvedčuje hlavne sekvenčná podobnosť ARE proteínov s elongačným faktorom EF-3 u kvasiniek. Do ARE podrodiny patrí široké spektrum rezistenčných proteínov ako napríklad: Vga(A), Vga(A)_{LC}, Msr(A), Lsa, Lmr(C).

Medzi klinicky najvýznamnejšie rezistenčné proteíny u stafylokokov patrí Vga(A) proteín udeľujúci rezistenciu ku streptogramínom A a jeho varianta Vga(A)_{LC}, ktorá navyše udeľuje rezistenciu k linkozamidom. Tieto oba proteíny sa medzi sebou líšia len

v siedmich aminokyselinách. V predchádzajúcich experimentoch sa zistilo, že za posun substrátovej špecificity od streptogramínov smerom k linkozamidom sú zodpovedné iba štyri aminokyseliny. Tieto štyri aminokyseliny sú nahlúčené na úseku dlhom len 15 aminokyselín vo vnútri linkeru, ktorý spája dve ABC domény. To ukazuje na funkčnú dôležitosť tejto časti proteínu, ako miesta určujúceho substrátovú špecificitu.

Cieľom tejto diplomovej práce bolo:

1. Porovnať vplyv variability aminokyselín Vga(A) a Vga(A)_{LC} proteínu na výsledný rezistenčný fenotyp.
2. Sledovať zmenu rezistenčného fenotypu udeleného mutovanými Vga(A) proteínmi, u ktorých budú mutácie vytvorené podľa nových Vga(A) variant, ktorých aminokyselinová sekvencia bola uverejnená v GenBank databáze.
3. Pripraviť konštrukty exprimujúce proteíny fúzované s proteínovou kotvou, ktorá umožní bunkovú lokalizáciu.

2. Literárny prehľad

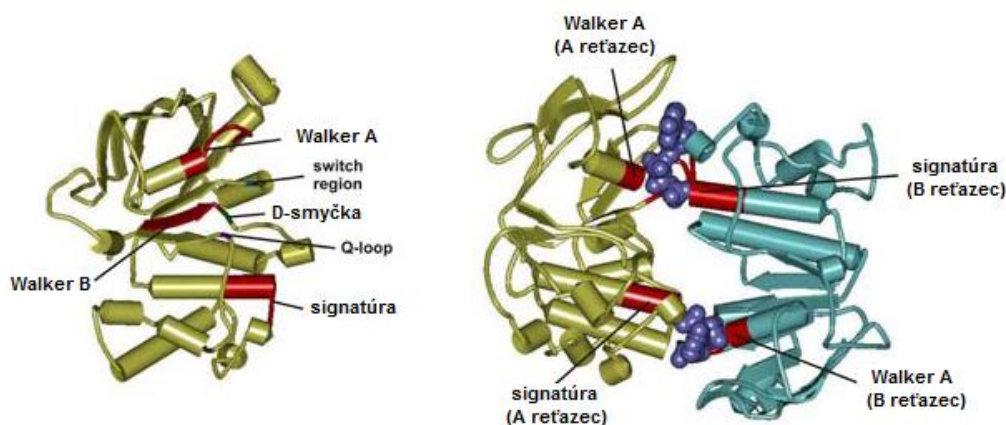
2.1. ABC PROTEÍNY

ABC proteíny tvoria veľkú proteínovú superrodinu, ktorých spoločným menovateľom je prítomnosť konzervovanej ATP-väzobnej domény, označovanej tiež ako ATP-viažúca kazeta (v angličtine ATP-Binding Cassete) (DAVIDSON *et al.* 2008). ABC proteíny boli identifikované u baktérií, archeí, eukaryot, ale taktiež u niektorých väčších vírusov.

Do tejto superrodiny patria transportné proteíny, ktoré získavajú energiu hydrolýzou ATP, kde je táto energia využívaná na transportné účely v bunke, ako je napríklad prenos rozpustných látok cez biologickú membránu. Medzi ABC proteíny však taktiež patria proteíny, ktoré využívajú hydrolýzu ATP pre iné bunkové procesy než je transport. Niektoré proteíny patriace do tejto podskupiny ABC proteínov, udeľujú rezistenciu na makrolidové, linkozamidové a streptogramínové antibiotiká (VASILIOU *et al.* 2009).

2.1.1. Štruktúra konzervovaných domén ABC transportérov

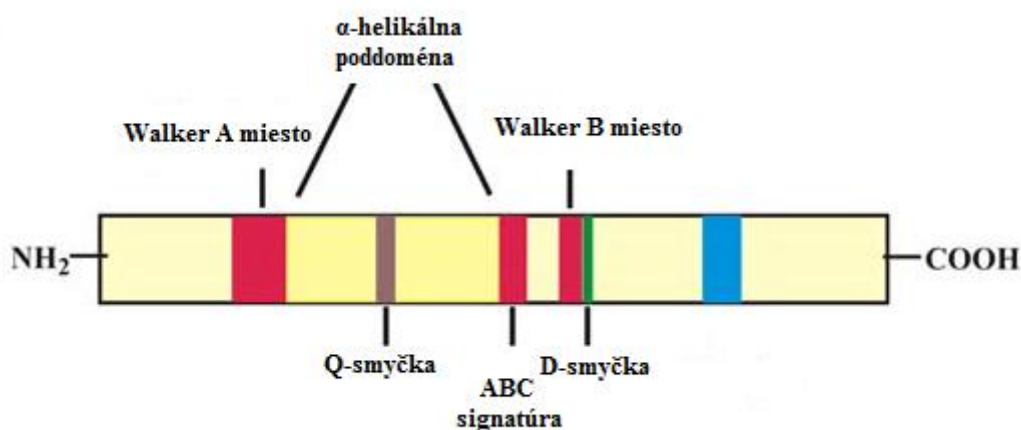
Klasický ABC transportér je tvorený dvoma transmembránovými doménami, ktoré sú zodpovedné za translokáciu substrátu skrz membránu a dvoma ATP-viažúcimi doménami vytvárajúcimi dimér, ktoré viažu a hydrolyzujú ATP.



Obr. 1. – Priestorová štruktúra monoméru NBD monomér ArtP proteínu *Geobacillus stearothermophilus* (v ľavo) a diméru NBD MalK₂ proteínu *Escherichia coli* (v pravo) (preložené z LICHT a SCHNEIDER, 2011).

ATP-väzobná doména je charakterizovaná niekoľkými krátkymi motívmi. Walker A taktiež označovaný ako P-smyčka (P-loop), pretože viaže fosfát a Walker B motív, ktorý viaže horčík, sú prítomné taktiež aj u ostatných ATPáz. Walker B motív obsahuje hydrofóbnu oblasť $\Phi\Phi\Phi\Phi D$, kde Φ je hydrofóbná aminokyselina (REES *et al.* 2009). Ostatné motívy sú charakteristické pre ABC proteíny a sú to: Q-smyčka (Q-loop), ktorá sa nachádza medzi Walker A a Walker B motívmi, ktorá obsahuje konzervované glutamínové zbytky. Ďalšou súčasťou ATP-väzobnej domény je konzervovaná sekvencia LSGGQ, ktorá je taktiež označovaná ako „signatúra“ pretože podľa prítomnosti tejto sekvencie je možné ABC proteíny odlišiť od ostatných ATPáz (LICHT a SCHNEIDER, 2011). Ďalším motívom je D-smyčka (D-loop), ktorá obsahuje aminokyselinovú sekvenciu SALD a je lokalizovaná za C-terminálnou oblasťou Walker B (KOS a FORD 2009).

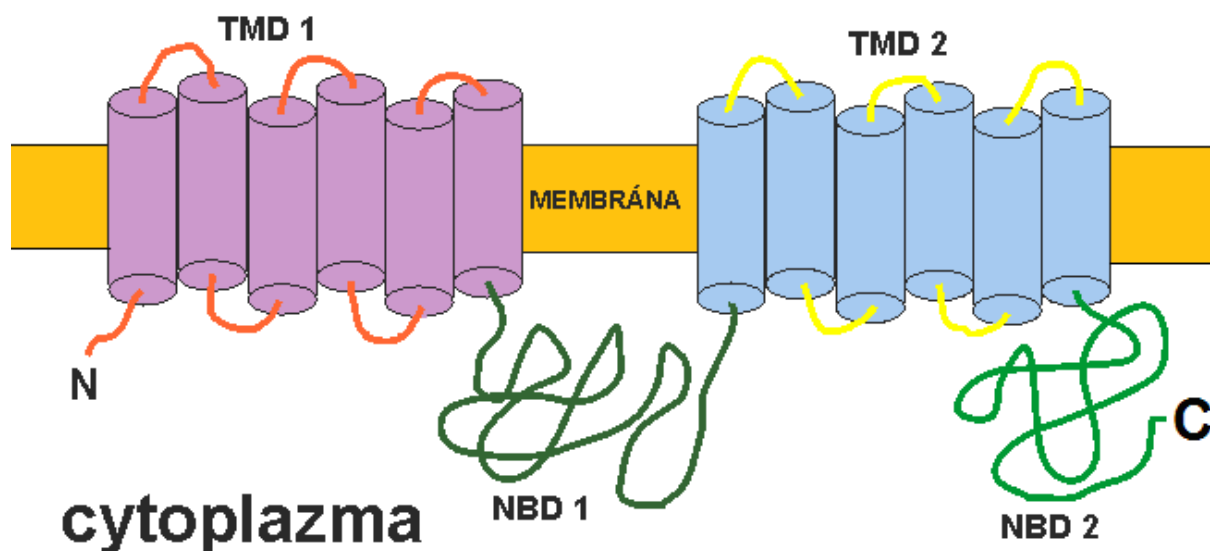
Z priestorového usporiadania týchto motívov získaných z kryštalických štruktúr ABC domien je možné pomerne presne určiť podiel konzervovaných motívov na hydrolýze ATP (Obr.1). Q-smyčka, ktorá sa nachádza v mieste kontaktu ABC domény s transmembránovou rozpoznáva γ -fosfát, viaže horčík a atakuje molekuly vody (LICHT a SCHNEIDER, 2011). LSGGQ motív interaguje s γ fosfátom na ATP a podieľa sa na hydrolýze fosfátu. ATP je v podstate u funkčného diméru dvoch ABC domien v kontakte s Walker A motívom jednej domény a LSGGQ motívom domény druhej (Obr. 2).



Obr. 2. - Lineárna prezentácia NBD s funkčnými miestami. (preložené z LICHT a SCHNEIDER, 2011).

Transmembránové domény ABC proteínov sú oproti ABC doménam len veľmi málo konzervované. V závislosti na proteíne obsahujú 5 – 10 úsekov prechádzajúcich cez membránu (REES *et al.* 2009). Tieto domény určujú substrátovú špecificitu ABC transportérov.

Transmembránové domény môžu byť fúzované s ABC doménami v jeden polypeptidový reťazec, alebo môžu byť syntetizované ako samostatné polypeptidové reťazce. Transmembránová doména môže dokonca u niektorých ABC proteínov chýbať (LICHT a SCHNEIDER 2011). Architektúra spojenia transmembránových domien a nukleotid-viažúcich domien závisí od triedy ABC transportérov. Najzákladnejší príklad (Obr. 3.) predstavuje spojenie 2 transmembránových domien (TMDs - transmembrane domains) a 2 nukleotid-viažúcich domien (NBDs - nucleotide-binding domains) v poradí prvá TMD, ktorá je spojená s prvou NBD. Druhá TMD je spojená s prvou a druhou NBD (PINKETT *et al.* 2007). Štruktúra transmembránových domien jednotlivých tried ABC transportérov je odlišná.



Obr. 3. – Spojenie transmembránovej domény 1 a 2 (nachádzajúcich sa v membráne) s nukleotid-viažúcimi doménami 1 a 2.

2.1.2. Mechanizmus transportu

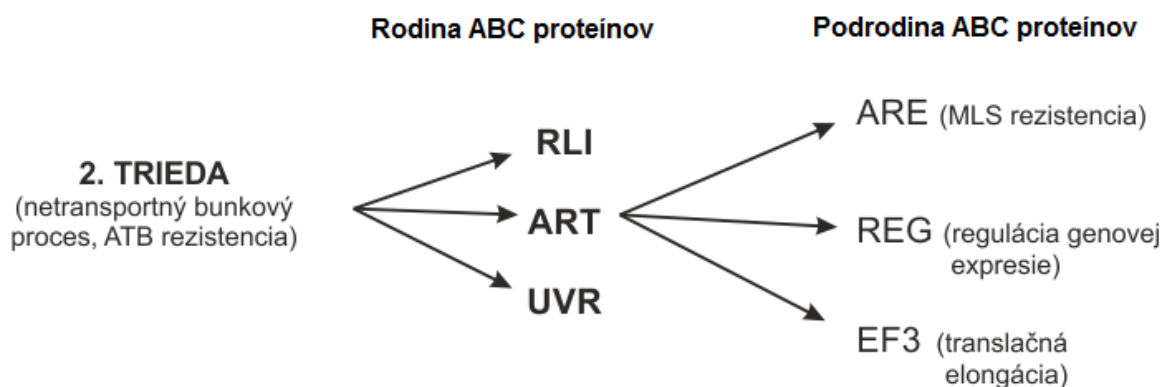
ABC transportéry umožňujú transport látok cez membránu proti koncentračnému gradientu. Aby tento transport mohol prebiehať je nutná energia, ktorá sa získava hydrolýzou ATP (REES *et al.* 2009). ABC domény hrajú dôležitú úlohu v energizácii celého procesu. Po naviazaní ATP na ABC domény dochádza k hydrolýze ATP za uvoľnenia energie. U P-glykoproteínu u cicavcov sa zistilo, že pri transporte dochádza k striedavej hydrolýze ATP na oboch NBDs. Hydrolýzou ATP si transportér „pamätá“ NBD, na ktorej došlo k hydrolýze ATP podľa naviazaného nehydrolyzovaného ATP na druhej NBD. Po hydrolýze ATP dochádza k uvoľneniu ADP a Pi, čo umožní naviazanie nového ATP (NARITA *et al.* 2003, SENIOR *et al.* 1995, URBATSCH *et al.* 1995). Uvoľnená energia, ktorá vznikla hydrolýzou ATP je využitá na zmenu konformácie transmembránovej domény, ktorej výsledkom je transport látok (export, import) cez membránu (LICHT a SCHNEIDER 2011).

2.1.3. Fylogenetické členenie ABC proteínov

Na základe fylogenetickej analýzy sekvencií ABC proteínov ich rozdeľujeme do troch tried. Prvá trieda je tvorená exportérmi, ktoré sú zodpovedné za exkréciu rôznych molekulárnych látok ako peptidy, lipidy, hydrofóbne liečivá, polysacharidy, toxíny a iné. Druhú triedu tvoria proteíny, ktoré nemajú transmembránovú doménu a ich funkcia je iná než transport. Niektoré proteíny tejto triedy môžu byť zapojené do translačných a opravných procesov, ale taktiež sú zodpovedné za vznik rezistencie na makrolidy, linkozamidy a streptogramíny. Tretia trieda je tvorená importérmi. Tento typ transportérov je dôležitý pre transport živín do bunky u prokaryot. Takýmto spôsobom sú do bunky transportované mono- a oligo-sacharidy, aminokyseliny, peptidy, zlúčeniny kovov, vitamíny a iné (DAVIDSON *et al.* 2008, LICHT a SCHNEIDER 2011).

2.1.4. Druhá trieda ABC proteínov

Tak ako už bolo spomenuté, do druhej triedy ABC proteínov patria cytoplazmatické proteíny, ktoré nemajú transportnú funkciu, keďže im chýba transmembránová doména (Obr. 4.). Tieto proteíny sú tvorené dvoma ABC doménami vytvárajúcimi dimér s dvomi tandemovými repetíciami nukleotid-viažúceho miesta. Ako bude ukázané nižšie, proteíny tejto triedy sa zúčastňujú regulačných procesov v bunke. Mimo to sem patria aj ARE proteíny (antibiotic resistance) udeľujúce rezistenciu k antibiotikám (DAVIDSON *et al.* 2008, LICHT a SCHNEIDER 2011). Táto trieda je ďalej delená na tri proteínové rodiny.



Obr. 4 – Rozdelenie 2. triedy ABC transportérov.

2.1.4.1. UVR rodina

Proteíny patriace do tejto rodiny sa zúčastňujú na excíznej oprave nukleotidov a antibiotikovej rezistencii. Za excízu opravu poškodenej DNA je zodpovedný UvrA proteín. DrrC proteín, ktorý patrí taktiež do tejto rodiny udeľuje rezistenciu *Streptomyces peuceticus* na daunorubicín. Tento mechanizmus rezistencie je sprostredkovaný UvrA-like proteínmi (LOMOVSKAYA *et al.* 1996).

2.1.4.2. RLI rodina

Druhá rodina označovaná ako RLI nesie označenie podľa RNáza L inhibítora. RLI proteín sa zúčastňuje regulácie translácie. Táto rodina proteínov je konzervovaná u eukaryot a archea (CHEN *et al.* 2006). Štúdie ukázali, že cicavčí RLI1 má za následok zmenu interferónovej produkcie a stabilitu MyoD proteínu a mitochondriálnych mRNA. RLI1 je taktiež asociovaný s ribozómami a Hcr1p, proteínom, ktorý sa zapája do iniciácie translácie a procesorovania rRNA. Deplécia RLI1 spôsobí defekt v transporte malej a veľkej ribozomálnej podjednotky z jadra, čoho výsledkom je zastavenie translačných procesov a zníženie veľkosti polyzómov (YARUNIN *et al.* 2005, KISPAL *et al.* 2005).

2.1.4.3. ART rodina

ART rodina ABC proteínov je ďalej členená na 3 podrodiny: EF-3 podrodina, REG podrodina a ARE podrodina proteínov (DAVIDSON *et al.* 2008).

2.1.4.3.1. EF-3 podrodina

Do tejto podrodiny patrí elongačný faktor 3, vyskytujúci sa u kvasiniek, ktorý je dôležitý pri elongácii translácie (ANDERSEN *et al.* 2006). Tak ako všetky ABC proteíny taktiež aj EF-3 disponuje hydrolytickou aktivitou, ktorej výsledkom je hydrolýza ATP. Uvoľnená chemická energia je premenená na energiu mechanickú, ktorej výsledkom je konformačná zmena ribozómov čo vedie k uvoľneniu EF-3 a deacylovenej tRNA. Výsledkom je uľahčenie väzby aminoacyl-tRNA do A miesta na ribozóme. Naviazanie aminoacyl-tRNA do A miesta zvyšuje aj EF-1, ktorý je stimulovaný EF-3 po interakcii s ribozómom (CHAKRABURTTY, 2001).

2.1.4.3.2. REG podrodina

Proteíny druhej podrodiny označované ako REG sa vyskytujú ako u eukaryot tak aj u prokaryot a zúčastňujú sa regulačných funkcií v bunke. U niektorých prokaryotických systémoch však presná funkcia nebola doposiaľ objasnená.

Eukaryotický proteín GCN20 sa zúčastňuje regulácie translácie, čo má za dôsledok zvýšenie aktivity transkripcie GCN4 v bunkách hladujúcich na aminokyseliny. GCN20 proteín je asociovaný s GCN1 proteínom. Tento komplex stimuluje aktivitu GCN2 kinázy, ktorá fosforyluje translačný iniciačný faktor eIF2, čo má za výsledok zvýšenie transkripčného aktivátora GCN4 (VAZQUEZ DE ALDANA *et al.* 1995).

Do tejto podrodiny patrí aj Uup proteín, ktorý je zodpovedný za presné vyštiepovanie transpozónov (MURAT *et al.* 2009)

2.1.4.3.3. ARE podrodina

Do ARE podrodiny ABC proteínov patria proteíny udeľujúce rezistenciu voči makrolidovým, linkozamidovým a streptogramínovým antibiotikám. Do dnešného dňa nie je s určitosťou pochopený mechanizmus tejto rezistencie. Makrolidové, linkozamidové a streptogramínové antibiotiká sa viažu na 50S podjednotku bakteriálneho ribozómu a tým inhibujú proteosyntézu. Doposiaľ boli vyslovené dve hypotézy o mechanizme rezistencie, ktorý udeľujú tieto proteíny. U prvej hypotézy je predpoklad aktívneho transportu antibiotika z bakteriálnej bunky. Záhadou je, že tieto proteíny nemajú transmembránovú doménu, ktorá by umožňovala transport antibiotík cez membránu. Navrhnutím druhej hypotézy sa predpokladá, že proteín môže ovplyvňovať väzbu antibiotika do svojho zásahového miesta na 50S podjednotke ribozómu. Druhej hypotéze nasvedčuje aj sekvenčná podobnosť s elongačným faktorom EF-3 u kvasiniek.

ARE proteíny sa líšia svojou schopnosťou udeľovať rezistenciu k makrolidovým, linkozamídovým a streptogramínovým antibiotikám. Tak napríklad Msr(A) proteín udeľuje rezistenciu k makrolidom a streptogramínom B, zatiaľ čo Vga(A) udeľuje rezistenciu k streptogramínom A a prípadne aj k linkozamidom. Okrem rezistenčných proteínov izolovaných z klinických izolátov stafylokokov sa tieto proteíny vyskytujú v organizmoch produkujúcich antibiotiká, najmä u streptomycét (MENDEZ a SALAS 2001). Tieto mikroorganizmy potrebujú ochranný mechanizmus proti antimikróbnym látkam, ktoré syntetizujú. Medzi gény zodpovedné za rezistenciu na makrolidy patrí *car(A)* gén zo *Streptomyces thermotolerans*, *smr(B)* gén zo *Streptomyces ambofaciens* a *tlr(C)* gén zo *Streptomyces fradiae*. Tieto gény udeľujú rezistenciu na 16-členné makrolidy carbomicín, spiramicín (SCHONER *et al.* 1992). Baktéria *Streptomyces lincolnensis* disponuje *lmr(C)* génom, ktorý pravdepodobne udeľuje rezistenciu na linkozamidy.

2.1.5 Rezistencia spôsobená ARE proteínmi

2.1.5.1.Msr(A) – rezistencia k makrolidom a streptogramínom B

Msr(A) bol prvýkrát popísaný v kmeni *Staphylococcus aureus*, ktorý bol izolovaný v Maďarsku (JÁNOSI a BÁN 1982) a následne bol objavený aj u koaguláza-negatívnych stafylokokov v USA (JENSSEN *et al.* 1987).

Tento proteín udeľuje inducibilnú rezistenciu na 14- a 15-členné makrolidy a streptogramíny B (MS_B fenotyp) a je to druhý najfrekvencovanejší determinant udeľujúci makrolidovú rezistenciu u stafylokokov. Induktorom pre zvýšenie expresie je erytromycín a iné 14- a 15-členné makrolidy (ROSS *et al.* 1990). Msr(A) proteín je dlhý 488 aminokyselín. Dve ATP-viažúce domény sú separované od seba aminokyselinovou sekvenciou bohatou na glutamín (Q-linker).

Pravdepodobnou funkciou tohto proteínu, ktorý spôsobuje rezistenciu na erytromycín a streptogramíny B je aktívny eflux, vzhľadom k tomu, že však Msr(A) tak ako ostatné ARE proteíny nedisponuje transmembránovou doménou, nie je možné vylúčiť aj iný rezistenčný mechanizmus (REYNOLDS *et al.* 2003). Pre transportnú funkciu nasvedčuje fakt, že bunky recipientného kmeňa *Staphylococcus aureus* RN4220, do ktorého bol *msr(A)* gén transformovaný, akumulovali menej rádioaktívne značeného erytromycínu ako kontrolné bunky bez *msr(A)* (ROSS *et al.* 1990). Práve na základe tohto pozorovania bolo predpokladané, že tento proteín pravdepodobne využíva pre svoju transportnú funkciu iný interagujúci transmembránový proteín v recipientnom kmeni

(ROSS *et al.* 1990). Sekvenčná analýza plazmidu pUL5050, z ktorého bol gén *msr(A)* izolovaný odhalila dva prídavne ORFs kódované upstream od *msr(A)*. Ich proteínové produkty by mohli spolu s Msr(A) tvoriť funkčný transportér. Gén *stp(A)* kóduje ABC doménu a gén *smpA* kóduje hydrofóbnu transmembránovú doménu. Naviac u recipientného kmeňa *Staphylococcus aureus* RN4220 boli identifikované veľmi podobné gény označené ako *stpC* a *smpC*. Napriek tomu inaktivácia týchto génov nemala vplyv na schopnosť *msr(A)* proteínu udeľovať rezistenciu MS_B fenotypu (ROSS *et al.* 1996).

V chromozóme *Enterococcus faecium* bol objavený gén označovaný ako *msr(C)*. Aj keď tento gén vykazuje oproti *msrA* génu len 53% homológiu (SINGH *et al.* 2001) pri prenesení tohto génu do kmeňa *Staphylococcus aureus* RN4220 došlo k zvýšeniu rezistencie na 14- a 15-členné makrolidy a streptogramíny B (REYNOLDS a COVE 2005). Zdá sa však, že *msr(C)* nezohráva u *Enterococcus faecium* hlavnú úlohu v rezistencii, keďže inaktíváciou génu nedošlo k výraznej zmene citlivosti na 14- a 15-členné makrolidy a streptogramíny B (SINGH *et al.* 2001).

V streptokokoch bola objavená ďalšia varianta génu, označovaná ako *msr(D)*. Tento gén je opäť súčasťou bakteriálneho chromozómu *Streptococcus pneumoniae* udeľuje len nízky stupeň rezistencie na 14-členné makrolidy a ketolidy. Msr(D) disponuje pomerne vysokou homológiou aminokyselinovou sekvenciou s Msr(A) proteínom (75% homológia) a MsrC (78% homológia) (REYNOLDS a COVE 2005).

2.1.5.2. Vga proteíny - rezistencia k streptogramínom A a znížená citlivosť k linkozamidom

Gén kódujúci Vga(A) proteín bol po prvýkrát identifikovaný u stafylokokov ako rezistenčná determinanta udeľujúca rezistenciu k streptogramínom (HAROCHE *et al.* 2000).

V literatúre bolo popísaných viacero variant proteínu Vga(A) medzi, ktoré patrí aj Vga(A)v a Vga(B). Schopnosť týchto génov udeľovať rezistenciu k makrolidovým, linkozamidovým a streptogramínovým antibiotikám bola porovnaná v štúdií Chesneau *et al.* (2005). V tejto práci boli gény kódujúce tieto proteíny prenesené do dvoch pôvodne citlivých stafylokokových recipientov, *Staphylococcus aureus* RN4220 a *Staphylococcus epidermidis* BM3302. Ukázalo sa, že gény kódujúce proteíny Vga(A) a Vga(A)v (83,2 % identita) boli schopné okrem streptogramínov (MIC = 32 µg/ml) udeľovať taktiež nízku hladinu rezistencie k linkomycínu (MIC = 4 µg/ml v prípade Vga(A) a MIC = 8 µg/ml v prípade Vga(A)v). Z tejto práce taktiež vyplynulo, že úroveň rezistencie je závislá na

hostiteľovi. Porovnaním MIC klindamycínu u kmeňa *Staphylococcus aureus* RN4220 (MIC = 0,25 µg/ml) a *Streptococcus epidermidis* BM3302 (MIC = 1 µg/ml), došlo k rozdielnym minimálnym inhibičným koncentráciám aj napriek tomu, že kmene obsahovali rovnaký gén. Avšak *vga(B)* gén (59% sekvenčná identita s *vga(A)*) udeľoval zníženú hladinu rezistencie na streptogramín A (MIC = 4 µg/ml), ale v prípade použitia antibiotika s komerčným názvom synercid (kombinácia streptogramínu A : streptogramínu B v pomere 7:3) došlo k zníženiu minimálnej inhibičnej koncentrácie na 2 µg/ml (CHESNEAU *et al.* 2005).

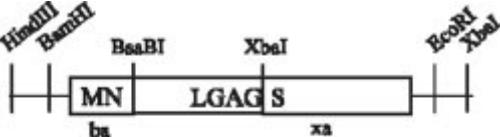
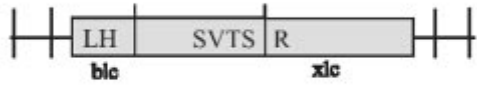
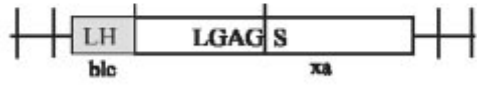

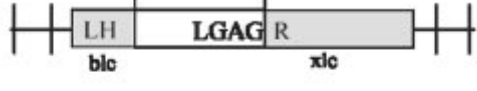
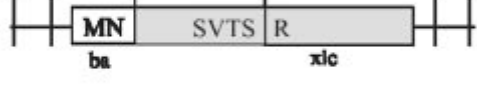
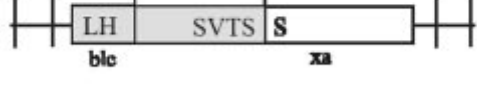
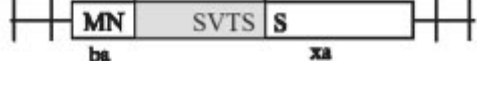
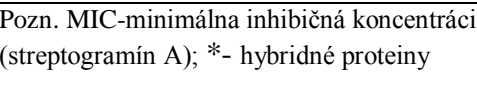
Gentry demonštroval, že *Vga(A)* proteíny majú taktiež schopnosť udeľovať rezistenciu na pleuromutilíny. Pleuromutilíny sú štruktúrne odlišné od linkozamidov a streptogramínov A, ale podobne inhibujú proteosyntézu u prokaryot (GENTRY *et al.* 2008). Proteín podobný *Vga(A)* bol nájdený na chromozóme sekvenovaného genómu *Listeria monocytogenes* a bol označený ako *Lmo0919*. *Lmo0919* je identický v 41% aminokyselinovej sekvencii s *Vga(A)* proteínom. Gén *Lmo0919* bol klonovaný do plazmidu pRB374 a následne testovaný na streptogramín A a linkomycín. MIC u streptogramínu A bola 8 µg/ml a u linkomycínu 4 µg/ml (CHESNEAU *et al.* 2005).

2.1.5.3. *Vga(A)*_{LC} - rezistencia k streptogramínom A a k linkozamidom (LS_A fenotyp)

Varianta *Vga(A)*_{LC} bola objavená v roku 2006 v našom laboratóriu v súbore klinických izolátov meticilín-rezistentných koaguláza-negatívnych stafylokokov, ktoré boli rezistentné na oba linkozamidy: linkomycín a klindamycín, ale zároveň boli citlivé na erytromycín (NOVOTNA *et al.* 2005). Táto nová varianta, udeľuje okrem streptogramínom A taktiež rezistenciu k linkozamidom (NOVOTNA a JANATA 2006). *Vga(A)*_{LC} sa od *Vga(A)* líšia len v 7 aminokyselinových zbytkoch. Dve aminokyselinové zámény sa nachádzajú v N-terminálnej časti proteínu, kde je substitúcia medzi *Vga(A)* a *Vga(A)*_{LC} proteínom v M4L (v 4 pozícii je zámena metionínu za leucín) a N9H. Zvyšných päť aminokyselinových zámien, L212S, G219V, A220T, G226S a S247R sa nachádza v oblasti linkeru, ktorý spája dve ABC domény. Aby bolo možné posúdiť, ktorá oblasť je zodpovedná za substrátovú špecifitu boli vytvorené hybridné proteíny kombinujúce jednotlivé úseky *Vga(A)* a *Vga(A)*_{LC} (Tab. I). Z údajov v tabuľke I. je zrejmé, že pokiaľ hybridný proteín obsahoval aminokyselinové zbytky z proteínu *Vga(A)* (L212, G219, A220, G226), tak rezistenčný profil bol podobný s proteínom *Vga(A)*, keďže tieto

hybridné proteíny udeľovali rezistentnosc iba na pristinamycín IIA. V prípade, že hybridný proteín obsahoval aminokyselinové zbytky z proteínu Vga(A)_{LC}, tak rezistenčný profil bol podobný s proteínom Vga(A)_{LC} (S212, V219, T220, S226). Proteíny obsahujúce tieto 4 aminokyselinové zbytky boli rezistentné na oba linkozamidy a streptogramín A. Avšak v prípade hybridného proteínu Vga(A)_{LC}ba obsahujúceho 4 aminokyselinové zbytky z Vga(A)_{LC} proteínu a zároveň obsahujúceho 2 aminokyselinové zbytky v N-terminálnej oblasti z Vga(A) proteínu (M4, N9), došlo k zvýšeniu účinnosti. Z toho je možné predpokladať, že tieto N-terminálne aminokyselinové zbytky (M4, N9) by mohli pravdepodobne zvyšovať interakciu s údajným transmembránovým proteínom (Novotná a Janata, 2006).

Tab. I. - Citlivosť kmeňa *Staphylococcus aureus* RN4220 obsahujúci pRB374 konštrukt s Vga(A), Vga(A)_{LC}, alebo ich hybridné proteíny. (prevzaté z práce Novotna a Janata, 2006)

Konštrukt	Plazmid alebo proteín exprimovaný v <i>S. aureus</i> RN4220	MIC (µg/ml)		
		LIN	CLI	PIIA
	pRB374	1	0,125	2
	Vga(A)	2	0,25	32
	Vga(A) _{LC}	8	2	8
	Vga(A)blc*	2	0,125	32
	Vga(A)xlc*	2	0,25	32
	Vga(A)blcxlc*	2	0,25	32
	Vga(A) _{LC} ba*	16	4	16
	Vga(A) _{LC} xa*	8	2	8
	Vga(A) _{LC} baxa*	16	4	16

Pozn. MIC-minimálna inhibičná koncentrácia; LIN- linkomycín, CLI- klindamycín, PIIA- pristinamycín IIA (streptogramín A); *- hybridné proteíny

2.1.5.4. Lsa – rezistencia k streptogramínom a linkozamidom

Rezistencia na linkozamidy a streptogramíny A označovaná tiež ako LS_A fenotyp je prirodzená u bakteriálneho kmeňa *Enterococcus faecalis* (DUH et al. 2001). Táto rezistencia je kódovaná *lsa* génom, ktorý kóduje Lsa proteín rovnakej podrodiny ABC proteínov ako vyššie spomínané proteíny (LINTON a HIGGINS 1998).

Inaktiváciou *lsa* génu došlo k zvýšeniu citlivosti na klindamycín, dalfopristín a quinupristín/dalfopristin, zatiaľ čo komplementáciou s rekombinantným plazmidom

nesúcim neporušený plazmid, došlo k obnoveniu rezistencie na klindamycín a dalfopristín (SINGH *et al.* 2002).

2.1.5.5. Lmr(C) proteín

Baktéria *Streptomyces lincolnensis* disponuje *lmr(C)* génom, ktorý je súčasťou génového klastru pre biosyntézu linkomycínu (KOBERSKA *et al.* 2008). Okrem *lmr(C)* sú v tomto klastre ďalšie dva gény *lmr(A)* a *lmr(B)*, u ktorých bola predpovedaná rezistenčná funkcia (Lmr – lincomycin resistance). Gén *lmr(A)* kóduje transportér z MFS (major facilitator superfamily) superrodiny, ktorý je pravdepodobne zodpovedný za sekréciu syntetizovaného linkomycínu do média. 23S rRNA metyltransferáza chrániaca ribozómy pred naviazaním linkomycínu je kódovaná *lmr(B)* génom (ZHANG *et al.* 1992). *Lmr(B)* je pravdepodobne hlavným nositeľom rezistencie k linkomycínu. Funkcia Lmr(C) proteínu kódovaného *lmr(C)* génom nie je dodnes objasnená.

2.1.6. Dve hypotézy mechanizmu funkcie ARE proteínov

U ARE proteínov chýba transmembránová doména. V nukleotidových sekvenciách týchto génov sú kódované len dve nukleotid-viažúce domény. Napriek tomu, že u proteínu Vga(A) bola potvrdená bunková lokalizácia na membráne, doposiaľ nebol identifikovaný žiadny membránový proteín, ktorý by skrz interakciu s ARE proteínmi zaisťoval lokalizáciu na membráne (CHESNEAU *et al.* 2005). Z toho dôvodu nie je možné isto vylúčiť iný mechanizmus rezistencie udeľovanej ARE proteínmi k makrolidovým, linkozamidovým a streptogramínovým antibiotikám.

Ross (2004) demonštroval pokus s rádioaktívne značeným erytromycínom [¹⁴C]. Tento pokus bol vykonávaný na bakteriálnych bunkách *Staphylococcus aureus*, ktoré exprimovali Msr(A) proteín. Výsledkom bola znížená akumulácia [¹⁴C] erytromycínu v bunkách, ktoré exprimovali Msr(A) proteín (ROSS *et al.* 1990). Podobný pokus bol vykonaný Novotnou (2006) s rádioaktívne značeným linkomycínom [³H] v bakteriálnych bunkách *Staphylococcus haemolyticus*, ktoré exprimovali Vga(A)_{LC} proteín. Podobne ako u erytromycínu, tak isto aj u linkomycínu došlo k zníženiu akumulácie rádioaktívne značeného linkomycínu (NOVOTNÁ a JANATA 2006). U oboch prípadoch bola akumulácia rádioaktívne značeného antibiotika v kontrolných bunkách vysoká. Tieto pokusy poukazujú na možnosť aktívneho transportu antibiotika z bakteriálnej bunky. Avšak nie je možné vylúčiť aj iné hypotézy.

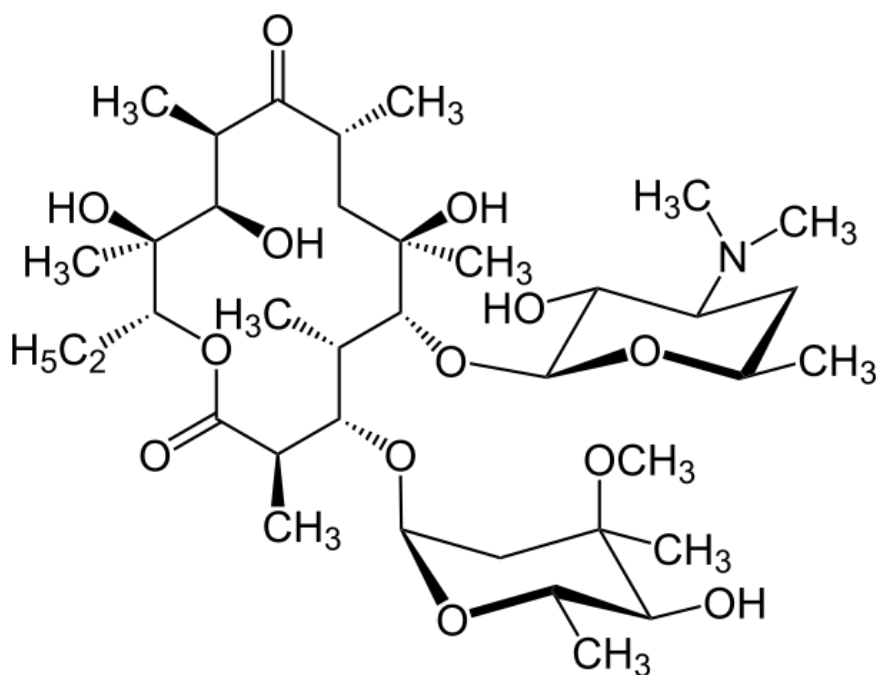
Alternatívnou hypotézou je rezistencia spôsobená zmenou väzby antibiotika do svojho zásahového miesta na ribozóme pôsobením týchto proteínov (REYNOLDS *et al.* 2003). Túto hypotézu potvrdzuje aj fylogenetická analýza ABC transportérov, podľa ktorej ARE proteíny patria do rovnakej rodiny ako niektoré ďalšie proteíny interagujúce s ribozómami (kapitola 2.1.3.)

2. 2. MAKROLIDY, LINKOZAMIDY A STREPTOGRAMÍNY (MLS antibiotiká)

Makrolidy, linkozamidy a streptogramíny patria do skupiny inhibítorov proteosyntézy. Aj napriek tomu, že sa jedná o štruktúrne odlišné látky, ich väzobné miesta sa prekrývajú na veľkej podjednotke 50S bakteriálneho ribozómu.

2.2.1. Štruktúra makrolidových, linkozamidových a streptogramínových antibiotík

Erytromycín (Obr. 5.) bol prvé makrolidové antibiotikum, využívané v klinickej praxi, predovšetkým na liečbu stafylokokových ochorení. Avšak erytromycín mal pomerne širokú škálu nežiaducich účinkov ako napríklad gastrointestinálne problémy a preto sa predpokladalo, že makrolidy v klinickej praxi nebudú využiteľné. Objavením ďalších antibiotík zo skupiny makrolidov sa podarilo potlačiť ich nežiaduce účinky (KUŽELOVÁ *et al.* 2010).



Obr. 5. – Chemická štruktúra erytromycínu.

(zdroj: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Erythromycin_A.svg)

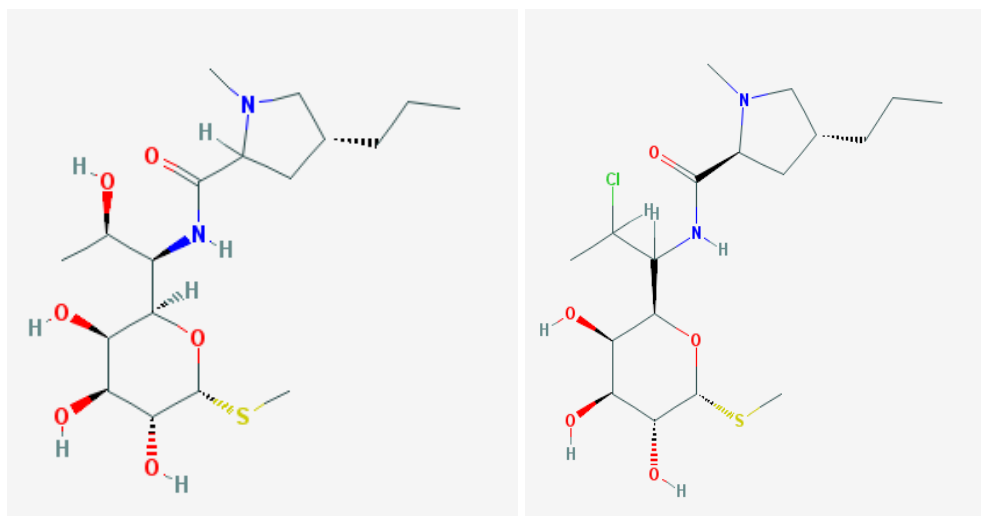
Štruktúra makrolidových antibiotík pozostáva z laktónového kruhu, ktorý je tvorený 14-timi alebo 16-timi uhlíkmi. Na laktónovom kruhu sú naviazané sacharidy. Tieto cukry môžu mať vo svojej molekule naviazanú aminokyselinu (označované ako aminosacharidy). Makrolidové antibiotika klasifikujeme podľa počtu uhlíkov v laktónovom kruhu (KUŽELOVÁ *et al.* 2010).

Medzi 14-členné makrolidy patrí erytromycín, klaritromycín, oleandomycín. Josamycín a spiramycín patrí medzi 16-členné makrolidy (LECLERCQ 2002, RETSEMA a FU 2001)

Okrem „klasických“ makrolidových antibiotík do tejto skupiny patria antiinfekčné liečivá, ktoré obsahujú azalidový, alebo ketolidový kruh. Azalidy (azitromycín) obsahujú vo svojom 15-člennom uhlíkatom laktónovom cykle dusík. Ketolidy (telitromycín) obsahujú 14-členný laktónový kruh a 3-keto skupinu, ktorá je naviazaná na deoxycukor (KUŽELOVÁ *et al.* 2010).

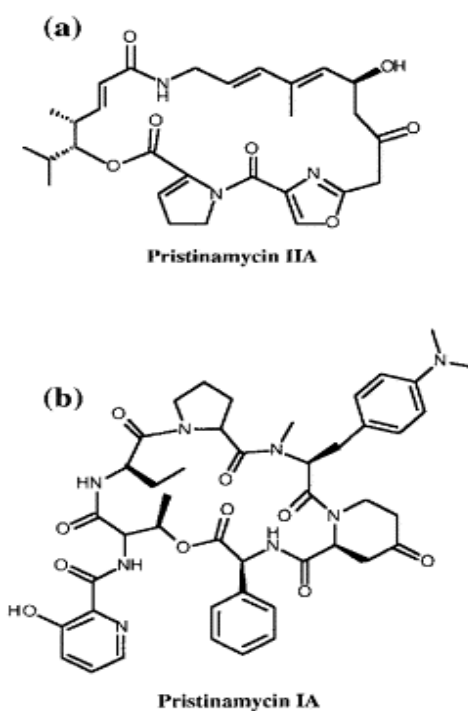
Medzi linkozamidy patrí antibiotikum linkomycín a jeho semisyntetický derivát klindamycín (Obr. 6.) (McCAFFERTY *et al.* 1999).

Linkomycín je antibiotikum prirodzene produkované *Streptomyces lincolnensis* (MASON *et al.* 1962). Táto skupina antibiotík pôsobí bakteriostaticky. Linkozamidy sa skladajú z cukornej zložky methylthiolinkosamidu (MTL) a aminokyselinového derivátu propylprolínu (PPL) Tieto dve zložky sú navzájom spojené amidovou väzbou. Klindamycín je semisyntetický derivát získaný chloráciou linkomycínu, čo vedie k zvýšeniu účinnosti antibiotika (MORAR *et al.* 2009).



Obr. 6. - Chemická štruktúra linkomycínu (vľavo) a chemická štruktúra klindamycínu (vpravo) (PubChem, NCBI)

Streptogramíny tvoria dve rôzne zlúčeniny streptogramíny A a streptogramíny B, ktoré majú synergický účinok. K streptogramínom typu A patrí pristinamycín IIA (Obr. 7a) a virginamycín M, ktoré sú polynenasytené cyklické makrolaktónové antibiotiká. Pristinamycín IA (Obr. 7b) a virginamycín S sú cyklické peptidové makrolaktónové antibiotiká patriace medzi streptogramíny typu B (McCAFFERTY *et al.* 1999). Klinicky najpoužívanéjšie sú nové syntetické deriváty pristinamycínu IA a IIA. Tento liek je dodávaný pod komerčným názvom Synercid a je zložený z dvoch účinných látok – quinupristínu a dalfopristínu. Quinupristín je chemisyntetický derivát odvodený od pristinamycínu IA a dalfopristín je chemisyntetický derivát odvodený od pristinamycínu IIA. Kombináciou týchto látok v pomere 3:7 došlo k zvýšeniu antimikrobného účinku (KUŽELOVÁ *et al.* 2010, LINCOVÁ *et al.* 2007).



Obr. 7. – Chemická štruktúra Pristinamycínu IIA (Obr. 7a) a Pristinamycínu IA (Obr. 7b)

(Zdroj: <http://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0022283698925098-gr1.gif>)

2.2.2. Mechanizmus účinku makrolidových, linkozamidových a streptograminových antibiotík

Mechanizmus účinku makrolidových antibiotík spočíva v inhibícii proteosyntézy (RETSEMA a FU 2001).

Ribozóm obsahuje 3 väzobné miesta pre tRNA (A-, P-, E-miesto). Po tom čo je proteosyntéza zahájená, každá aminokyselina je pripojovaná rovnakým spôsobom: v P-mieste je naviazaná tRNA s rastúcim polypeptidovým reťazcom. Aminoacyl-tRNA, nesúca ďalšiu aminokyselinu je na základe párovania bázy medzi kodónom a antikodónom pripojená do A-miesta. V ďalšom kroku je karboxylový koniec polypeptidového reťazca odštiepený, čo umožní väzbu s voľnou aminoskupinou aminokyseliny, ktorá sa nachádza v A-mieste. Vytvorenie väzby je umožnené peptidyltransferázovou aktivitou ribozómu a je spojené s translokáciou peptidyl-tRNA predĺženej o jednu aminokyselinu z A-miesta do P-miesta. tRNA je z P-miesta presunutá do E-miesta a uvoľnené A-miesto môže viazať ďalšiu aminoacyl-tRNA a celý cyklus sa opakuje (ALBERTS et al. 2008).

Makrolid, ktorý sa viaže blízko výstupu polypeptidového reťazca z tunelu spôsobuje zabránenie výstupu polypeptidového reťazca z ribozomového tunelu, čím dochádza k disociácii peptidyl-tRNA a k predčasnému ukončeniu translácie (RETSEMA a FU 2001). Účinkom erytromycínu je výsledná dĺžka disociovej peptidyl-tRNA v rozsahu 6-8 aminokyselinových zvyškov (TENSION et al. 2003).

Inhibícia proteosyntézy linkozamidmi je tak isto spôsobená disociáciou peptidyl-tRNA z ribozómu v dôsledku blokácie výstupu polypeptidového reťazca z tunelu. Rozdiel v mechanizme účinku spočíva iba vo vzdialenosti väzby linkozamidových antibiotík od peptidyltransferázového miesta. Účinkom klindamycínu je výsledná dĺžka disociovej peptidyl-tRNA v rozsahu 2-4 aminokyselinových zvyškov (TENSION et al. 2003).

Streptogramín A a streptogramín B sa viaže na 50S podjednotku bakteriálneho ribozómu a inhibuje elongáciu proteínu. Zaujímavosťou je, že streptogramíny B majú mechanizmus podobný ako 14-členné makrolidy spôsobujúce predčasné uvoľnenie z nekompletného peptidového reťazca (McCAFFERTY et al. 1999). Streptogramín A má schopnosť sa viazať do peptidyltransferázového miesta, len v prípade pokiaľ tam nie je naviazaná aminoacyl-tRNA. Po naviazaní streptogramínu A do peptidyltransferázového miesta sa zablokuje naviazanie aminoacyl-tRNA (VANNUFFEL a COCITO 1996). Streptogramíny A a B sú produkované súčasne jednou baktériou rodu *Streptomyces* (JOHNSTON et al. 2002). Ich bakteriostatický účinok je pomerne slabý v prípade, že sú

podávané samostatne. Zvýšenie účinku a baktericídny účinok sa docieli ich kombináciou v pomere 3:7 (quinupristín:dalfopristín) (KUŽELOVÁ *et al.* 2010).

2.2.3. Klinické využitie makrolidových, linkozamidových a streptogramínových antibiotík

Spektrum účinku makrolidových antibiotík zahŕňa gram-pozitívne baktérie (stafylokoky, streptokoky) , ale taktiež aj gram-negatívne baktérie. Makrolidy patria medzi antibiotiká využívané tiež v liečbe atypických ochorení, medzi ktoré zaraďujeme mykoplazmy, legionely, chlamýdie. Účinok týchto antibiotík je bakteriostatický, avšak pri vysokých koncentráciách sa dosahuje baktericídneho účinku. Patria k alternatívnej liečbe u pacientov alergických na penicilínové antibiotiká. Tieto zlúčeniny sú pomerne acidostabilné, preto sú vhodné aj na perorálne použitie, kedy sú odolné voči žalúdočným kyselinám. Najmenej acidostabilný je erytromycín (LINCOVÁ *et al.* 2007).

Linkomycín a klindamycín sú bakteriostatické antibiotiká, ktoré sú účinné proti gram-pozitívnym kokom ale aj anaerobným baktériám. Sú alternatívnou liečbou u ľudí alergických na penicilínové antibiotiká (LINCOVÁ *et al.* 2007).

V klinickej praxi sa využíva kombinácia oboch streptogramínov a to dalfopristínu (streptogramín B) a quinupristínu (streptogramín A) (KUŽELOVÁ *et al.* 2010).

2.3. REZISTENCIA NA MAKROLIDY, LINKOZAMIDY

A STREPTOGRAMÍNY

Rezistencia na makrolidové antibiotika môže zahŕňať viaceré mechanizmy. Medzi tieto mechanizmy patrí:

- modifikácia cieľového miesta
- enzymatická inaktivácia antibiotika
- aktívny eflux

2.3.1. Rezistencia spôsobená modifikáciou cieľového miesta

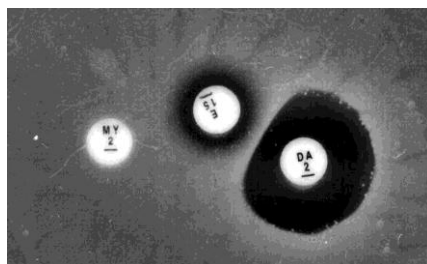
Najznámejším a najrozšírenejším mechanizmom MLS rezistencie je modifikácia cieľového miesta. Tento mechanizmus je spoločný pre všetky makrolidové, linkozamídové a streptogramínové antibiotiká, keďže väzobné miesta týchto látok na 50S podjednotke bakteriálneho ribozómu sa z veľkej časti prekrývajú. Existujú tri rôzne modifikácie cieľového miesta. Sú to: modifikácia spôsobená Erm metyltransferázou, Cfr metyltransferázou a bodovou mutáciou.

2.3.1.1. Rezistencia spôsobená Erm metyltransferázou

Za vznik tejto rezistencie je zodpovedný *erm* gén, ktorý kóduje S-adenozyl dependentnú metyltransferázu, ktorá metyluje adenín na 23S rRNA v pozícii 2058 (A2058, u *E.coli*). Tento adenín sa nachádza v peptidyltransferázovom regióne V. domény 23S rRNA. Metylácia v tejto pozícii zabraňuje väzbe makrolidového antibiotika na ribozómalnu podjednotku. Takáto modifikácia cieľového miesta spôsobuje skríženú rezistenciu k makrolidom, linkozamidom a streptogramínom typu B (MLS_B rezistencia). Rezistencia je nezávislá na koncentrácii antibiotika, minimálna inhibičná koncentrácia (MIC) dosahuje hodnôt vyšších ako 512 mg/l z toho dôvodu, že ochrana ribozómu je absolútna (WEISBLUM 1995).

Na základe tohto, akým spôsobom dochádza k exprimovaniu *erm* génov rozlišujeme indukibilnu a konštitutívnu rezistenciu. Inducibilná rezistencia (iMLS_B) je charakterizovaná produkciou Erm metylázy len v prítomnosti indukujúceho antibiotika, pričom induktorom sú 14-členné a 15-členné makrolidy. Neindukujúce antibiotiká zostávajú v tomto prípade aktívne. Pri konštitutívnej rezistencii (cMLS_B) je Erm metyláza produkovaná neustále. Výsledkom je skrížená rezistencia ku všetkým MLS_B antibiotikám (FIEBELKORN *et al.* 2003).

Inducibilnu a konštitutívnu MLS_B rezistenciu je možné odlíšiť dvojíťm diskovým difúznym testom. Disk s indukujúcim antibiotikom je umiestnený vedľa disku s neindukujúcim antibiotikom vo vzdialenosti 15-20 mm. Pokiaľ je rezistencia inducibilná (Obr. 8) dochádza k vytvoreniu inhibičnej zóny v tvare písmena D okolo klindamycínového disku. V prípade konštitutívnej rezistencie nedochádza k vytvoreniu inhibičných zón. (FIEBELKORN *et al.* 2003).



Obr. 8. - $iMLS_B$

Do dnešného dňa je objavených množstvo adenín- N^6 -metyltransferáz, ktoré sa vyskytujú nielen u producentov antibiotík ale aj u patogénnych baktérii. Stafylokoky disponujú pomerne širokým množstvom génov kódujúcich Erm metylázy, medzi najčastejšie patrí *Erm(A)*, *Emr(B)*, *Erm(C)*, *Erm(Y)* (MARYLIN *et al.* 1999).

2.3.1.2. Rezistencia spôsobená Cfr metyltransferázou

U baktérii *Staphylococcus sciuri* bol po prvý krát objavený *cfr* gén, ktorý udeľuje rezistenciu voči viacerým antibiotikám (KEHRENBURG *et al.* 2005). *Cfr* gén kóduje metyltransferázu, ktorá je zodpovedná za posttranskripčnú modifikáciu 23S rRNA. Metyltransferáza metyluje adenín v pozícii A2503. Tento adenín sa nachádza v oblasti peptidyltransferázového miesta (VESTER a DOUTHWAITE 2001). Bolo dokázané, že prítomnosť tohto génu znižuje citlivosť k florfenikolom, linkozamídom, oxazolidínonom, pleuromutilínom a streptogramínom A ($PhLOPS_A$ fenotyp) (LONG *et al.* 2006).

2.3.1.3. Modifikácia cieľového miesta spôsobená mutáciami

Modifikácia cieľového miesta môže byť spôsobená aj mutáciami v tejto oblasti. Presnejšie mutácia guanínu v pozícii 2057 (G2057), adenínu 2058 a 2059 (A2058, A2059) v V. doméne 23S rRNA udeľuje rezistenciu na niekoľko makrolidových, linkozamídových

a streptogramínových antibiotík. Tieto mutácie boli popísané v klinických izolátoch bakteriálnych druhov *Helicobacter pylori*, *Propionibacterium acnes* a *Mycobacterium species* (VERSALOVIC *et al.* 1995, ROSS *et al.* 1996, MEIER *et al.* 1997, TENSION *et al.* 1997). Okrem mutácii v V. doméne boli popísané aj mutácie v II. doméne 23S rRNA (DAM *et al.* 1996).

2.3.2. Enzymatická inaktivácia antibiotika

Makrolidové antibiotiká môžu byť účinkom enzýmov degradované alebo modifikované.

Medzi enzýmy degradujúce makrolidové antibiotika u stafylokokov patrí 14- a 16-členná makrolidová esteráza kódovaná *ere* génom. Tieto esterázy inaktivujú antibiotikum hydrolytickým štiepením laktónového kruhu (Md fenotyp) (WONDRACK *et al.* 1996). U *E. coli* bola identifikovaná erytromycínová esteráza typu I, ktorá je kódovaná *ereA* génom (OUNISSI a COURVALIN 1985), erythromycínová esteráza typu II kódovaná *ereB* génom (AUTHUR *et al.* 1986)

K enzýmom zodpovedných za modifikáciu makrolidov patria fosfotransferázy (2'-fosfotransferáza). Fosfotransferáza modifikujúca len 14-členné makrolidy je kódovaná *mphA* génom. Fosfotransferáza inaktivujúca 14- a 16-členné makrolidy je kódovaná *mphB* génom. Tieto enzýmy sú zodpovedné za fosforyláciu antibiotika, čím sa antibiotikum stáva neúčinné (Mm fenotyp) (O'hara *et al.* 1989).

Inaktivácia linkozamidov je spôsobená adenyláciou linkozamid-O-nukleotidyltransferázami (Lm fenotyp). Tieto enzýmy sú kódované *linA* a *linA'* génom. Po prvýkrát bol *linA* gén izolovaný u *Staphylococcus haemolyticus* a *linA'* gén u *Staphylococcus aureus* (NAKAJIMA 1999).

Streptogramíny A sú inaktivované acetyltransferázami, ktoré sú kódované *vat* génom. Enzým spôsobí naviazanie hydroxylovej skupiny na antibiotikum, čo zabráni väzbe na ribozóm (HARMS *et al.* 2004).

Streptogramíny B sú inaktivované hydrolytickým štiepením s následnou linearizáciou cyklického antibiotika (Sd fenotyp). Za enzymatickú inaktiváciu je zodpovedná hydroláza kódovaná *vgb* génom. Takto modifikované antibiotikum nie je schopné väzby na ribozóm (ALLIGNET *et al.* 1988).

2.3.3. Rezistencia spôsobená ARE podrodinou ABC proteínov

Medzi rezistenčné proteíny ARE podrodiny ABC proteínov patrí Msr(A) proteín udeľujúci rezistenciu k makrolidom a streptogramínom B, Vga(A) proteín udeľujúci rezistenciu k streptogramínom A a čiastočne k linkozamidom, Vga(A)_{LC} a Lsa proteín udeľujúci rezistenciu k linkozamidom a streptogramínom A. Do tejto podrodiny patria taktiež gény kódujúce rezistenčné proteíny vyskytujúce sa u prirodzených producentov antimikróbných látok (charakterizované v kapitole: 2.1. ABC transportéry)

2.4. BAKTERIÁLNY ROD *STAPHYLOCOCCUS*

Rod *Staphylococcus* patrí medzi najrozšírenejšie bakteriálne druhy. V súčasnej dobe je uznávaných 55 druhov a poddruhov tohto rodu. Rozdeľujeme ich do dvoch hlavných skupín, ktorých významným diferenciačným znakom je produkcia plazmakoagulázy. Podľa produkcie plazmakoagulázy rozdeľujeme stafylokoky na koaguláza – pozitívne (patria medzi patogénne mikroorganizmy) a koaguláza – negatívne (donedávna považované za nepatogénne mikroorganizmy, ktoré sú súčasťou fyziologickej flóry). Medzi najvýznamnejší druh patrí *Staphylococcus aureus*, ktorý je častý pôvodca bakteriálnych infekcií (JULÁK 2010).

2.4.1. História bakteriálneho rodu

Stafylokoky boli po prvý krát pozorované v roku 1880 škótskym chirurgom Alexandrom Ogstonom. Jednalo sa o mikroskopický preparát hnisu z abscesu pacienta, v ktorom popísal množstvo guľatých mikroorganizmov, ktoré sa nachádzali v zhlukoch. V roku 1882 nazval Alexander Ogston nájdene mikroorganizmy stafylokokmi. Odvodil ich od slova gréckeho významu *staphyle*, čo v preklade znamená strapec (OGSTON 1880, OGSTON 1881).

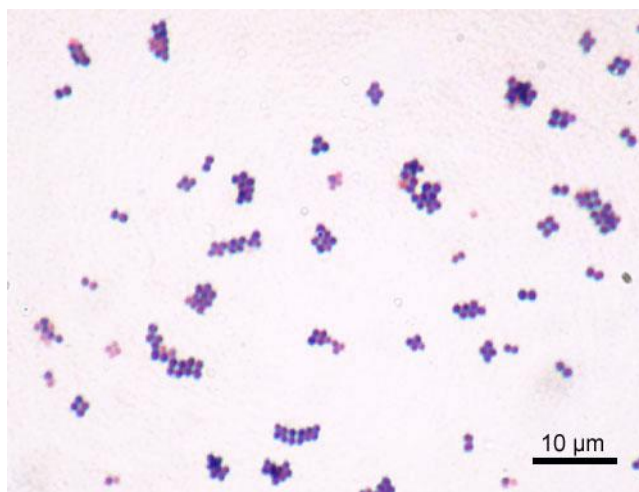
2.4.2. Morfológia a fyziológia bakteriálneho rodu *Staphylococcus*

Stafylokoky patria medzi gram-pozitívne koky. Sú nepohyblivé, nesporulujúce, fakultatívne anaeróbne a kataláza pozitívne (schopnosť rozkladať peroxid vodíka na vodu a kyslík).

V mikroskopickom preparáte vytvárajú charakteristické zhľuky v tvare hrozna (Obr. 9). Môžu byť usporiadané aj jednotlivo, v pároch alebo v zhlukoch (nie je ich možné druhové odlíšenie pomocou mikroskopického obrazu). Baktérie majú priemer približne 1 µm. Sú rastovo nenáročné a veľkosť kolónií dosahuje rozmery v rozmedzí 1 až 3 mm.

Bunková stena stafylokokov obsahuje okrem peptidoglykánu, ktorý tvorí podstatnú časť bunkovej steny tak isto aj proteín A a kyselinu teichoovú. Externá vrstva bunkovej steny môže byť obalená polysacharidovým puzdrom. Hrubé puzdro a hlienovité kolónie sú charakteristické pre puzdrový typ 1 a 2 (MURRAY *et al.* 2005).

Na povrchu bunkovej steny sa môžu nachádzať adhezíny, proteíny ktoré uľahčujú kolonizáciu nielen kože ale aj slizníc a taktiež umožňujú ich prilnutie k medzibunkovej hmote alebo na povrch hostiteľských buniek (BEDNÁŘ 1996).



Obr. 9. – Mikroskopický preparát baktérie *Staphylococcus aureus* farbený podľa Grama
(prevzate z http://en.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus)

2.4.3. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus rozdeľujeme na dva poddruhy (subspecies): *Staphylococcus aureus subsp. aureus* a anaeróbny *Staphylococcus aureus subsp. anaerobius*, ktorý sa u človeka izoluje zriedkavo (VOTAVA 2003).

Baktéria *Staphylococcus aureus* disponuje rôznymi faktormi virulencie, ktoré umožňujú jej adhezivitu, prienik do organizmu a množenie. Jednotlivé faktory virulencie baktérie *Staphylococcus aureus* sú uvedené v tabuľke II.

Génom stafylokokov sa skladá z cirkulárneho chromozómu a prídavných genetických elementov ako sú inzerčné sekvencie, transpozóny, plazmidy, profágy a nedávno popísane genómove ostrovy (NOVICK 2003). Veľkosť cirkulárneho genómu bakteriálneho druhu *Staphylococcus* je v rozmedzí od 2,67 do 3,07 Mbp, zastúpenie GC párov sa pohybuje v rozmedzí od 32,4% do 33%. (NCBI).

Prvé kompletne analyzované genómy boli genómy dvoch kmeňov *Staphylococcus aureus* v roku 2001 (KURODA *et al.* 2001).

Tab.II – Faktory virulencie baktérie *Staphylococcus aureus*

FAKTORY VIRULENCIE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>		
viazané na bunkovú stenu	extracelulárne produkty	špecifické toxíny
puzdro	koaguláza	hemolyzíny – alfa, beta, gama, delta toxín
peptidoglykán	kataláza	P-V leukocidín
proteín A	hyaluronidáza	exfoliatívne toxíny
kyselina teichoová	fibrinolýzín	TSST-1
zhlukovací faktor	lipáza	enterotoxíny
adhezíny	nukleáza	
	proteáza	
	tvorba biofilmu	

2.4.4. Koaguláza-negatívne stafylokoky

Ešte v 60. rokoch minulého storočia boli koaguláza-negatívne stafylokoky považované za nepatogénne mikroorganizmy, ktoré sú súčasťou fyziologickej flóry človeka ale aj zvierat (VERHOEF *et al.*, 1971). Medzi najčastejšie koaguláza-negatívne stafylokoky patrí *Staphylococcus haemolyticus* (najčastejšie izolovaný z hemokulúr), *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis* a *Staphylococcus hominis*. Na rozdiel od *Staphylococcus aureus* nie sú koaguláza-negatívne stafylokoky vybavené takým množstvom faktorov virulencie (VON EIFF *et al.* 2002).

V minulosti sa predpokladalo, že koaguláza – negatívne stafylokoky sa vyskytujú ako súčasť bežnej flóry a občasne môžu spôsobiť nezávažné infekcie. V niektorých zahraničných štátoch, napríklad USA, sú koaguláza-negatívne stafylokoky považované za častých nozokomiálnych patogénov. Dnes sú považované za podmienené patogény (PETRÁŠ 2010).

2.4.5. Vzťah človeka k ochoreniam vyvolaných baktériou *Staphylococcus sp.* a ich epidemiológia

Staphylococcus aureus sa môže v ľudskom tele vyskytovať ako súčasť prirodzenej flóry a v prípade dostatočnej obranyschopnosti organizmu nemusí spôsobovať žiadne ochorenie. Až 30 % ľudskej populácie je nosičom tejto baktérie aj bez toho aby mali klinické príznaky. Najčastejšie sa vyskytuje na nosovej sliznici, koži, perineu, hrubom čreve, horných cestách dýchacích a tiež na vaginálnej sliznici. U imunologicky zdravej populácie spôsobuje nezávažné kožné ochorenia (folikulitída, kožný absces, impetigo), infekcie respiračného traktu vrátane zápalu prínosových dutín (najčastejšie po vírusovej infekcii). Môže vyvolať hnačky, ktoré sú spôsobené stafylokokových enterotoxínom, ale taktiež môže vyvolať syndróm toxického šoku. U dlhodobého užívania antibiotík môžu vznikáť postantibiotické komplikácie, kedy došlo k narušeniu prirodzenej črevnej flóry, kde následne po pomnožení baktérie *Staphylococcus aureus* môže spôsobovať hnačky až pseudomembránovú enterokolitídu (VOTAVA 2003).

U imunosuprimovaných pacientov môže spôsobovať závažne až život ohrozujúce ochorenia, ktoré sú zodpovedné za zhoršenie už predchádzajúceho komplikovaného zdravotného stavu. Medzi ne patrí napríklad osteomyelitída, ktorá môže byť spôsobená sepsou. Pri septickom stave hrozí nielen diseminácia do kosti, ale aj do ostatných vnútorných orgánov (VOTAVA 2003).

Staphylococcus aureus je taktiež dôležitým nozokomiálnym patogénom, ktorý je schopný spôsobiť nozokomiálnu infekciu, teda ochorenie, ktoré vzniklo v súvislosti s pobytom v nemocničnom zariadení. Vznik a následný rozvoj infekcie spôsobených baktériou *Staphylococcus aureus* uľahčuje aj prítomnosť cudzieho telesa (BEDNÁŘ 1996).

Koaguláza-negatívne stafylokoky vyvolávajú ochorenia predovšetkým u pacientov s oslabeným imunitným systémom (imunologicky kompromitovaných), či u pacientov s nízkym alebo vysokým vekom. Ďalšou skupinou sú pacienti so zavedenými, či implantovanými transplantátmi z plastov alebo kovov. Poslednou skupinou, predisponovanou k infekcii koaguláza-negatívnymi stafylokokmi sú intravenózne narkomani (PETRÁŠ 2010). Koaguláza-negatívne stafylokoky spôsobujú infekcie krvného obehu, endokarditídy, infekcie operačných rán a infekcie dolných močových ciest (KOLÁŘ *et al.*, 2006).

Za zdroj baktérie *Staphylococcus aureus* sa považuje človek a zviera. Najčastejšie kolonizuje dýchací trakt zvierat (ošípané, hydina). Najčastejšou cestou prenosu je

kvapôčková infekcia, či priamy styk s prenášačom. Neojedinelé sú taktiež endogénne infekcie vlastným kmeňom (BEDNÁŘ, 1996).

2.4.6. Rezistencia bakteriálneho rodu *Staphylococcus*

Jednou z najčastejších príčin rezistencie baktérie *Staphylococcus aureus* je tvorba betalaktamáz, ktoré sú schopné efektívne štiepiť beta-laktámový kruh penicilínových antibiotík. V literatúrach je uvádzaná rezistencia na penicilín u 80 – 90 % izolátov (VOTAVA 2003).

Pomerne nebezpečný je meticilín rezistentný *Staphylococcus aureus* označovaný aj ako MRSA. Tieto MSRA izoláty sa vyznačujú tým, že do svojej výbavy prijali *mecA* gén. *MecA* gén kóduje modifikovaný penicilín viažuci proteín označovaný ako PBP2a, ktorý má nízku, respektíve minimálnu afinitu k beta-laktamovým antibiotikám (VOTAVA 2001). PBP2a pôsobí ako transpeptidáza a preberá funkciu klasických PBP proteínov, ktoré sú inaktivované beta-laktamázami. MRSA má veľmi často skríženú rezistenciu aj na iné antimikróbne látky ako napr. makrolidy, linkozamidy a streptogramíny. U týchto kmeňov nie je ničím výnimočným aj multirezistencia (BERGER-BACHI 1997).

Ako rezervné antibiotikum (označované aj ako antibiotikum poslednej voľby) pre liečbu MSRA patrí vankomycín. Avšak v roku 2002 bol prvý krát izolovaný vankomycín rezistentný kmeň, ktorý vo svojej genetickej výbave obsahoval *vanA* rezistenčný klaster genov. Pravdepodobný prenos je založený na konjugatívnom prenose génu z vankomycín rezistentného enterokoka. Tieto izoláty sú označované ako vankomycín rezistentný *Staphylococcus aureus* označovaný ako VRSA (JENKINS 2006).

3. Materiál a metódy

3.1. Materiál

3.1.1. Bakteriálne kmene

Escherichia coli JM109 (Promega)

Tento kmeň bol použitý na klonovanie a pomnoženie plazmidov.

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (r_K⁻ m_K⁺) supE44 relA1 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI^qZΔM15].*

Stellar™ Competent Cells (Clontech)

Stellar™ kompetentné bunky boli používané na cielenú mutagenézu a klonovanie metódou In-Fusion.

Genotyp: *F⁻, endA1, supE44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, phoA, Φ80d lacZΔ M15, Δ (lacZYA - argF) U169, Δ (mrr - hsdRMS - mcrBC), ΔmcrA, λ-*

XL1-Blue Competent Cells (Stratagene)

XL1-Blue kompetentné bunky boli používané pre cielenú mutagenézu metódou QuikChange.

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]*.

Escherichia coli GM2929

Kmeň GM2929 slúžil ako akceptorový kmeň pre transformáciu plazmidov pRB374 a pJAKO. Tento kmeň obsahuje mutácie *dam-* a *dcm-*. Bol použitý na produkciu nemetylovanej plazmidovej DNA. Nemetylovanú plazmidovú DNA bolo nutné použiť jednak v prípade štiepenia restriktčnými enzýmami, ktoré sú citlivé k *dam* a *dcm* metylácii (*BsaBI*, *XbaI*) a jednak pre prípravu nemetylovaných plazmidov pre transformáciu do *Staphylococcus aureus* RN4220.

Genotyp: *dam-13:Tn9 dcm-6 hsdR2 recF143 mcrA0 mcrB9999 galK2 galT22 ara-14 lacY1 xyl-5 thi-1 tonA31 rpsL136 hisG4 tsx-78 mtl-1 supE44 leuB6 rfbD fhuA13*.

***Staphylococcus aureus* RN4220 (Focus Bio-Inova)**

Kmeň *Staphylococcus aureus* RN4220 bol požitý ako recipientný kmeň pre expresiu proteínov Vga(A) a Vga(A)_{LC} a ich mutovaných variant a pre sledovanie rezistenčného fenotypu udeľovaného týmito proteínmi.

***Staphylococcus aureus* ATCC25923**

Tento kmeň bol používaný ako citlivý kontrolný kmeň pri stanovovaní citlivosti diskovou difúznou metódou.

***Staphylococcus aureus* ATCC29213**

Tento kmeň bol používaný ako citlivý kontrolný kmeň pri stanovovaní minimálnych inhibičných koncentrácií agarovou dilúčnou metódou.

3.1.2. Vektory

pRB374 (5,9 kbp)

pRB374 patrí medzi kyvadlové vektory. Obsahuje konštitutívny promótor *vegII* z *Bacillus subtilis*, ktorý je funkčný nielen v *B. subtilis* a *Staphylococcus aureus*. Ako selekčný marker sa využíva prítomnosť génov *amp* (rezistencia na ampicilín), *neo* (rezistencia na kanamycín a neomycín) a *ble* (rezistencia na bleomycín a phleomycín). Vektor bol používaný na klonovanie v *E. coli*, a k expresii proteínov v *Staphylococcus aureus* RN4220.

pJAKO (2,96 kbp)

pJAKO klonovací vektor bol odvodený od pBluescript II KS⁺ (Stratagene), ktorý bol pripravený v našom laboratóriu (J. Janata, J. Kopecký). Tento vektor nesie modifikovaný polylinker, ktorý uľahčuje prenos fragmentov medzi klonovacím a expresným vektorom.

3.1.3. Kultivačné média

LB médium

Zloženie:

Trypton	10 g
Kvasničný extrakt	5 g
NaCl	5 g
Dest. H ₂ O doplniť na objem	1000 ml
pH = 7,5	

LB agar

Zloženie:

Agar	15 g
LB médium	1000 ml
pH = 7,5	

SOC médium

Zloženie:

Trypton	20 g
Kvasničný extrakt	5,5 g
1 M NaCl	10 ml
1 M KCl	2,5 ml
Destilovaná H ₂ O	970 ml

pH = 7,5

po sterilizácii:

2 M MgCl ₂	5 ml (sterilizovaný filtráciou)
2 M MgSO ₄	5 ml (sterilizovaný filtráciou)
2 M glukóza	10 ml (sterilizovaný filtráciou)

B₂ médium

Zloženie:

Kaseínový hydrolyzát	10 g
Kvasničný extrakt	25 g

K ₂ HPO ₄	1 g
Glukóza	5 g
NaCl	25 g
Dest. H ₂ O doplniť na objem	1000 ml
pH = 7,5	

NYE agar

Zloženie:

Kaseínový hydrolyzát	10 g
Kvasničný extrakt	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Dest. H ₂ O doplniť na objem	1000 ml
pH = 7,5	

BHI agar

Zloženie:

Mozgovo-srdcová infúzia	9,25 g
Agar	3,75 g
Dest. H ₂ O doplniť na objem	250 ml
pH = 7,5	

Médium na stanovenie citlivosti

MHA (Müller-Hinton agar), Merck, Nemecko

Zloženie:

Müller-Hinton agar	34 g
Dest. H ₂ O doplniť na objem	1000 ml

Všetky vyššie spomínané média boli sterilizované autoklavovaním pri teplote 121°C po dobu 15 minút.

Médium pre uchovávanie kompetentných buniek

Zloženie:

Polyethylenglykol (Mw=8000)	3,6 g
Glycerol	10,8 ml
1M MgSO ₄	0,36 ml
LB médium doplniť na objem	30 ml

Prípravené médium je sterilizované fyzikálnou metódou - filtráciou.

3.1.4. Roztoky a pufry

Fyziologický roztok

Zloženie:

Chlorid sodný	0,85 g
Destilovaná voda	100 ml

Príprava:

Navážené množstvo chloridu sodného zodpovedajúce koncentrácii fyziologického roztoku (0,9%) sa doplní požadovaným množstvom vody a nechá sa rozpustiť. Sterilizuje sa autoklavovaním pri teplote 121°C po dobu 15 minút.

Roztok glycerolu (10%)

Zloženie:

Glycerol	10,08 ml
Destilovaná voda	89,92 ml

Príprava:

10 % roztok glycerolu sa sterilizuje filtráciou.

10% SDS

SDS	10 g
Dest. H ₂ O doplniť na objem	100 ml

Príprava: Po rozpustení sa roztok sterilizuje filtráciou.

Cell Lysis Müller pufo

10 mM Tris-HCl; 400 mM NaCl; 2 mM EDTA; pH = 8

TES pufo

1 M Tris-HCl; 0,5 M EDTA; 25g sacharózy (V=100ml); pH = 8

1 x TAE pufo

40 mM Tris-acetát; 1 mM EDTA; pH = 8,0

10 x DNA vzorkový pufo

50 mM EDTA; 1% SDS; 40 % sacharóza; 0,25 % bromfenolová modrá; 10 mM Tris-HCl; pH = 8,0

TE⁻¹ pufo

10 mM Tris-HCl; 0,1 mM EDTA; pH = 8,0

Ligačný pufo

10 x pufo pre T4 DNA ligázu (Fermentans)

Restrikčný pufo

10 x pufo pre restriktázu (použitie presného pufru je odporúčané výrobcom, pufo 1, 2, 3, 4, U - univerzálny) (New England Biolabs)

Pufo pre polymerázu

10 x LA complete PCR pufo (Top-Bio)

5 x Phusion GC pufo (Finnzymes)

Antibiotiká

Zásobné roztoky antibiotík sú 1000 x koncentrované. Využívajú sa na selekciu testovaných baktérii na kultivačných platniach.

karbenicilín 100 mg/ml – rozpustené v destilovanej vode

kanamycín 80 mg/ml – rozpustené v destilovanej vode

Roztoky antibiotík (linkomycín (Sigma), klindamycín (Sigma), pristnamycín IIA (Aventhis Pharma)) na prípravu minimálnych inhibičných koncentrácií boli pripravované s koncentráciou 10 mg/ml.

Disky napustené klindamycínom (2 µg/disk), linkomycínom (2 µg/disk) a erytromycínom (15 µg/disk) boli zakúpené od firmy Oxoid (Veľká Británia).

Antibiotiká klindamycín a linkomycín boli zakúpený od firmy Sigma.

3.1.5. Oligonukleotidy

Primery, ktoré boli používané v experimentálnej časti boli pripravené firmou Sigma alebo Promega. Primery boli riedené TE^{-1} pufrom alebo sterilnou destilovanou vodou na pracovnú koncentráciu 10 pmol/ μ l. Zoznam všetkých primerov používaných v experimentálnej časti je uvedený v tabuľke III.

Tab. III. – Zoznam mutačných primerov, používaných v experimentálnej časti

Názov primeru	Mutačné primery pre syntézu mutovanej časti génu <i>vga(A)</i> _{LCBA}
LTGAG	CTTAAGTTTATCTGAAGGCAAAATAACAGGAGCAAAGCCATACTTTGCAGGTAAGCAA AAGAAG
LGTS	GAAAACTTAAGTTTATCTGAAGGCAAAATAAAAGGAACAAAGCCATACTTTGCAAGT AAGCAAAAGAAG
LVTs	AACCTTAAGCTTATCTGAAGGCAAAATAAAAGTAACTAAGCCATACTTTGCCAGTAAGC AA
LGAS	AACCTTAAGCTTATCTGAAGGCAAAATAAAAGGAGCTAAGCCATACTTTGCCAGTAAGC AA
SVTG	AACCTTAAGCTCATCTGAAGGCAAAATAAAAGTAACTAAGCCATACTTTGCCGTAAGC AA
SGAG	AACCTTAAGCTCATCTGAAGGCAAAATAAAAGGAGCTAAGCCATACTTTGCCGTAAGC AA
SVAS	AGCTCATCTGAAGGCAAAATAAAAGTAGCTAAGCCATACTTTGCCAGTAAGCAAAAGA AGTTAC
SGTG	GAAAACTTAAGTTTATCTGAAGGCAAAATAAAAGGAACAAAGCCATACTTTGCAGGT AAGCAAAAGAAG
SGTS	AGCTCATCTGAAGGCAAAATAAAAGGACTAAGCCATACTTTGCCAGTAAGCAAAAGA AGTTAC
Primery potrebné na In-Fusion reakciu a prípravu značených proteínov	
Vga-HindIII-F	TATAATTTGCAAGCTTATGAAATAATGTTAGAGGGAC
Vga-BamHI-R	CGGTACCCGGGGATCCTTATTTATCCAAATTTCTTTTTTC
Primery na prípravu značených proteínov	
vgaA-IF-BamHI-Flag-R	CGGTACCCGGGGATCCTTACTTATCATCATCATCCTTGTAATCTTTATCCAAATTTCTTT TTTC
vgaA-IF-HindIII-6His-F	TATAATTTGCAAGCTTATGCATCATCATCATCATCATAAAATAATGTTAGAGGGAC
vgaA-IF-HindIII-Flag-F	TATAATTTGCAAGCTTATGGATTACAAGGATGATGATGATAAGAAAATAATGTTAGAG GGAC
Primery používané pre overenie úspešnosti elektroporácie pomocou metódy PCR	
pRB374 F	GTGCACCCAAGTATCTT
pRB374 R	GTCCGTTACACTAGAAAA
16U1 F	GTTTGATC(AC)TGGCTCAG
16SC R1	CTGCTGGCACGTAGTTA
Primery používané pri sekvenácii	
M13F	GTAAAACGACGGCCAGT
M13R	GCGGATAACAATTCACACAGG
Primery používané pri sekvenácii	
VgaK2F	GTAACACGAACTATATTCG
pRB374 F	GTGCACCCAAGTATCTT
pRB374 R	GTCCGTTACACTAGAAAA

3.1.6. Enzýmy

Restrikčné endonukleázy (New England Biolabs)

Bam-HI (NEB 3 pufo, BSA, reakčná teplota 37°C)

BlpI (NEB 4 pufo, reakčná teplota 37°C)

BsaBI (NEB 2 pufo, reakčná teplota 60°C)

BsrFI (NEB 2 pufo, reakčná teplota 37°C)

BstBI (NEB 4 pufo, reakčná teplota 65°C)

EcoRI (NEB U pufo, reakčná teplota 37°C)

HindIII (NEB 2 pufo, reakčná teplota 37°C)

KpnI (NEB 1 pufo, BSA, reakčná teplota 37°C)

NsiI (NEB 3 pufo, reakčná teplota 37°C)

XbaI (NEB 2 pufo, BSA, reakčná teplota 37°C)

DNA polymeráza

LA DNA polymeráza mix 5 U/μl (Top-Bio)

Phusion® High-Fidelity DNA polymeráza 2 U/ μl (New England Biolabs)

Ligáza (Fermentas)

T4 DNA ligáza 1U/ μl

Lysozým (Sigma)

Pracovná koncentrácia 20 mg/ml

Lyzostafín (Sigma)

Pracovná koncentrácia 1 mg/ml

Ribonukleáza A (Sigma)

Pracovná koncentrácia 20 mg/ml

Proteináza K (Sigma)

Pracovná koncentrácia 20 mg/ml

3.1.7. Komerčné súpravy a štandardy

Izolácia plazmidovej DNA z *E. coli*:

Nucleobond® Xtra Midi/Maxi (Machinery-nagel)

Nucleospin® Plasmid (Machinery-nagel)

Wizard® *Plus* SV Minipreps DNA purification System (Promega)

Izolácia DNA z agarózového gélu:

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

Prečistenie PCR zmesi pred restriktčným štiepením:

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

Štandarda molekulovej hmotnosti u DNA agarózovej elektroforézy:

1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen). Štandard obsahuje fragmenty od 100 bp do 12000 bp. Pri nanesení 5 µl štandardu obsahuje fragment o veľkosti 1650 bp 40 ng DNA. Pomocou tohto štandardu môžeme odčítať približnú koncentráciu vzorky DNA.

Príprava: 100 µl 1 kb Plus DNA ladder

100 µl 10 DNA vzorkový pufo

800 µl TE⁻¹ pufru

3.1.8. Použité chemikálie

chemikália	skratka	výrobca
2'- deoxyadenozín-5'-trifosfát	dATP	Fermetans
2'- deoxycytidín-5'-trifosfát	dCTP	Fermetans
2'- deoxyguanozín-5'-trifosfát	dGTP	Fermetans
2'- deoxytymidín-5'-trifosfát	dTTP	Fermetans
Acetón		Lachema
Agar		Oxoid
Agaróza		Invitrogen
Brómfenolová modrá		Bio-Rad
Dodecylsulfát	SDS	Serva

Ethanol	EtOH	Lachema
Ethidium bromid	EtBr	Sigma
Ethylendiamintetraacetát	EDTA	Sigma
Glukóza		Merck
Glycerol		Lachema
Glycín		Lachema
Hydrogenfosforečnan draselný	K ₂ HPO ₄	Lachema
Hydroxid sodný	NaOH	Lach-Ner
Chlorid bárnaty	BaCl ₂	Lachema
Chlorid draselný	KCl	Chemapol
Chlorid sodný	NaCl	Lach-Ner
Isopropanol		Lachema
Kanamycín	KAN	Amresco
Karbenicilín	CAR	Sigma
Kaseín hydrolyzát		Fluka
Klindamycín	CLI	Fluka
Kvasničný extrakt		Oxoid
Kyselina chlorovodíková	HCL	Lachema
Kyselina sírová	H ₂ SO ₄	Lachema
Linkomycín	LIN	Sigma
Methanol	MetOH	Lachema
Mozgovo-srdcová infúzia	BHI	Oxoid
Polyetylenglykol (M _r = 8000)		Sigma
Pristinamycín IIA	PIIA	Aventis Pharma S.A.
Sacharóza		Lachema
Síran horečnatý	MgSO ₄ .7H ₂ O	Lachema
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Tris	Aldrich
Trypton		Difco

Ostatné použité chemikálie boli bežne dostupné látky analytickej čistoty.

3.1.9. Software a internetové aplikácie

Geneious Pro 5.5.6. – program pre analýzu sekvencií

BLAST – internetová stránka pre porovnávanie sekvencií (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)

GenBank – databáza sekvencií (<http://ncbi.nlm.nih.gov/genbank>)

3.1.10. Prístroje a zariadenia

Analytické váhy	Ohaus, Švajčiarsko
Box s laminárnym prúdením vzduchu	Clean Air, Holandsko
Centrifúga 5415R	Eppendorf, Nemecko
Centrifúga BR4i	Thermo Scientific, USA
Centrifúga MR23i	Thermo Scientific, USA
Centrifúga J6-MI	Beckman coulter, USA
Digitálny fotoaparát	Olympus, Nemecko
Digitálne váhy MXX-212	Denver Instrument, NY
Digitálne váhy XE-410D	Denver Instrument, NY
Electrophoresis Pow.Sup. EPS 500/400	Pharmacia-LKB, USA
FPP elektroporátor	MBÚ, Česká republika
Inkubačná trepačka	Infors-HT, Švajčiarsko
MinicyclerTM	MJ Research, USA
NanoDrop 1000	Thermo Scientific, USA
SDP1010 SpeedVac Systém	Thermo Savant, USA
pH-meter MP225	Mettler Toledo, USA
Skener 8600T	Canon, Japonsko
Spektrofotometer Hélios Gama	ATI Unicam, UK
Termoblok	Grant, GB
Thermocycler T1	Whatman Biometra, Nemecko
Thermocycler TGradient	Whatman Biometra, Nemecko
Transluminátor ECX-26.MX	Vilber Lourmat, Francúzsko
Vodný kúpeľ CC1	Huber, Nemecko
Vortex MS2 Minishaker IKA	IKA-Works, USA
Zdroj elektroforézy EC-103	E-C Apparatus Corporation, NY
Zdroj elektroforézy E835	Consort, Belgicko

3.1.11. Použité konštrukty

V tejto diplomovej práci boli použité konštrukty uvedené v práci Novotna a Janata (2006). Všetky tieto vyššie spomínané konštrukty boli poskytnuté Mgr. Gabrielou Novotnou, Ph.D. Postup prípravy je uvedený v článku Novotna a Janata (2006). Konštrukt $V_{ga(A)_{LC} \times aLVTS}$ bol vytvorený Michaelou Kroovou ako súčasť jej diplomovej práce.

3.2. Metódy

3.2.1. Kultivácia a uchovávanie baktérií

3.2.1.1. Kultivácia a uchovávanie *Escherichia coli*

Kultivácia buniek *E. coli* prebiehala na pevnej pôde (LB agar) pri teplote 37°C cez noc, alebo v LB médiu v trepačke pri teplote 37°C, 16-18 hodín, pri otáčkach 200 RPM (otáčky za minútu). Pre selekciu buniek nesúcich vektor sa používalo príslušné antibiotikum. Bunky, ktoré boli kultivované na pevných pôdach boli uchovávané pri teplote 4°C (platne boli obalené parafilmom). Približne každé 2 týždne sa kmene preočkovali na čerstvý agar.

3.2.1.2. Kultivácia a uchovávanie *Staphylococcus aureus* RN4220

Bakteriálny kmeň *Staphylococcus aureus* RN4220 a jeho deriváty boli dlhodobo uchovávané pri teplote – 75°C v 10 % glycerole. Kmene boli kultivované v B2 médiu v trepačke pri teplote 37°C, 16 - 18 hodín a otáčkach 200 RPM. V prípade kultivácie na pevných pôdach boli tieto kmene kultivované na NYE agare pri teplote 37°C/ 24-48 hodín. Kmene obsahujúce vektor boli kultivované so selekčným antibiotikom. Bakteriálne kmene kultivované na pevných pôdach boli uchovávané pri teplote 4°C (platne boli taktiež obalené parafilmom). Približne každé 2 týždne sa kmene preočkovali na čerstvý agar. V prípade dlhodobého uskladnenia boli jednotlivé bakteriálne kmene resuspendované v BHI médiu s 20 % glycerolom a uchovávané pri teplote – 75°C.

3.2.2. Príprava a transformácia kompetentných buniek

Kompetentné bunky sa vyznačujú tým, že sú schopné prijať cudzorodú DNA. Okrem genetických vlastností závisí úspešná transformácia aj na inkubačných podmienkach, ktoré zaistia vytvorenie priepustnej bunkovej steny pre DNA.

3.2.2.1. Príprava kompetentných buniek *E. coli* pre transformáciu teplotným šokom

Oba kmene používané v experimentálnej časti (*E. coli* JM109 a *E. coli* GM2929) boli pripravované rovnakým spôsobom. Pri príprave kompetentných buniek sa do média pridáva ešte 10 mM MgSO₄ a 0,2% glukóza.

1. Prvotnou fázou pri príprave kompetentných buniek bola príprava inokula. Inokulum bolo pripravované zaočkovaním kolónie do 2 ml LB média a kultivované v trepačke pri teplote 37°C/ 16-18 hodín a otáčkach 200 RPM.
2. Zo 110 ml LB média (s prídavkom 1,1 ml 20 % glukózy, 1,1 ml 1M MgSO₄) bolo odobraných 10 ml média a zvyšný objem sa nechal vytemperovať v trepačke pri 37°C. Po vytemperovaní sa zaočkoval 1 ml inokula a okamžite sa zmierala OD (optická denzita) pri vlnovej dĺžke 600 nm, oproti slepej vzorke (OD₆₀₀ bude +/- 0,04). Kultúra sa nechala rásť do OD₆₀₀ = 0,4 – 0,6.
3. Po dosiahnutí OD₆₀₀ = 0,4 – 0,6 bolo potrebné kultúru ihneď schladiť, uložením banky do ľadu na 10 minút (najlepšie voda a ľad).
4. Kultúra sa preliala do vopred vychladených 50 ml sterilných kónických skúmaviek a centrifugovala sa vo vychladenej centrifúge pri 1500 g (3000 RPM)/ 11 minút/ 4°C.
5. Po centrifugácii sa opatrne odsal supernatant a bunky sa resuspendovali v 1 ml LB média odobraného na začiatku procedúry (10 ml média odobraného na začiatku procedúry). Bunky sa opatrne resuspendovali, nevortexovali sa a neustále sa chladili.
6. Po resuspendovaní buniek sa pridalo 5 ml média na uchovávanie kompetentných buniek a dobre, ale zároveň opatrne sa celá suspenzia premiešala.
7. Následne sa bunky prepipetovali po 100 µl alikvotách do predchladených mikroskúmaviek a zamrazili pri teplote – 75°C

3.2.2.1.1. Transformácia kompetentných buniek *E. coli* teplotným šokom

K transformácii sú používané bakteriálne bunky, ktoré sú schopné prijať cudzorodú DNA pôsobením teplotného šoku, čo vedie k čiastočnej destabilizácii cytoplazmatickej membrány.

1. K alikvot (V=100 µl) buniek *E. coli* bolo pridaných 1 µg plazmidovej DNA a opatrne sa celá suspenzia premiešala.
2. Celá zmes bola inkubovaná na ľade po dobu 25 – 30 minút.
3. Po inkubácii na ľade boli bunky podrobené tepelnému šoku pri teplote 42°C po dobu 1 minúty.
4. Suspenzia bakteriálnych buniek bola prenesená opäť do ľadu na 2 minúty. Následne bol pridaný 1 ml LB média vytemperovaného na teplotu 37°C. Celá

zmes bola kultivovaná pri teplote 37°C, 1-2 hodiny, v rotačnej trepačke (200 RPM)

5. Po kultivácii boli bunky krátko zcentrifugované, a LB médium odstránené tak aby v mikroskúmvke ostalo približne 100 µl média so sedimentovanými bunkami (médium nutne na resuspendáciu).
6. Resuspendované médium bolo prenesené na LB agar s prídavkom selekčného antibiotika a platne boli inkubované pri teplote 37°C/ 24 hodín.

3.2.2.2. Príprava kompetentných buniek *S. aureus* RN 4220 pre transformáciu elektroporáciou

1. Prvý deň bolo potrebné rozočkovať kmeň *S. aureus* RN4220 na BHI agar a nechať kultivovať 37°C/24-48 hodín.
2. Po kultivácii bola odobraná jedna kolónia a zaočkovaná do 5 ml B₂ média. Kultúra bola kultivovaná cez noc pri teplote 37°C a pri otáčkach 200 RPM.
3. Pripravilo sa 50 ml B₂ média vytemperovaného na teplotu 37°C. Odoberal sa 1 ml suspenzie kultivovanej cez noc a zaočkoval sa do 50 ml B₂ média. Zmerala sa počiatočná optická denzita OD₆₀₀ (ako slepá vzorka sa používa čisté B₂ médium).
4. Kultúra bola kultivovaná pokiaľ optická denzita nedosiahla OD₆₀₀ = 0,5 – 0,8.
5. Po dosiahnutí požadovanej optickej denzity boli bunky centrifugované pri otáčkach 8000g, 10 minút a teplote 20°C.
6. Bunky boli resuspendované v 50 ml sterilnej deionizovanej vody a centrifugované sa pri otáčkach 8000g, 15 minút a teplote 20°C.
7. Bunky boli opäť resuspendované v 20 ml 10 % glycerolu a centrifugované pri otáčkach 8000g, 15 minút a teplote 20°C.
8. Resuspendované bunky v 5 ml 10% glycerolu boli inkubované 15 minút pri laboratórnej teplote. Bunky sa znova centrifugovali pri otáčkach 8000g, 15 minút a teplote 20°C.
9. Kompetentné bunky boli resuspendované v 800 µl 10 % glycerolu a suspenzia sa rozdelila po 25 µl alikvotách do mikroskúmviek a nechala sa zamraziť pri teplote -75°C.

3.2.2.2.1. Transformácia kompetentných buniek *S. aureus* RN4220 elektroporáciou

Princípom elektroporácie je vytvorenie pórov na povrchu bakteriálnej bunky pôsobením elektrického impulzu čo má za následok prijať cudzorodú DNA. Elektroporácia bola vykonávaná na FPP elektroporátore vyrobeného v dielňach MBÚ.

1. K alikvot (V=25 μ l) buniek *S. aureus* RN4220 bolo pridaných 1 μ g plazmidovej DNA (maximálny objem nesmie byť väčší ako 5 μ l) a opatrne sa celá suspenzia premiešala.
2. Suspenzia buniek s plazmidovou DNA bola inkubovaná pri laboratórnej teplote 10 minút.
3. Po inkubácii pri laboratórnej teplote boli bunky opatrne prenesené medzi elektroporačné disky, vydezinfikované acetónom. Po uzavretí aparátu boli bunky vystavené elektrickému impulzu (300 V a 32 μ F) po dobu 2 sekúnd.
4. Po elektrickom impulze boli bunky okamžite prevrstvené 200 μ l B₂ média a opatrne prepipetované do mikroskúmavky do ktorej sa pridalo ešte 300 μ l B₂ média.
5. Bunky boli následne inkubované na ľade po dobu 10 minút.
6. Po inkubácii sa médium s bunkami umiestnilo do trepačky, kde sa nechalo kultivovať pri teplote 37°C, 1 hodinu, pri otáčkach 200 RPM.
7. Následne sa bunky opatrne a krátko zcentrifugovali a odpipetovalo sa také množstvo supernatantu aby v mikroskúmavke ostalo približne 100 μ l supernatantu spolu s usadeným peletom. Bunky sa opatrne pipetou resuspendovali.
8. Bunková suspenzia sa vysiala na NYE agar s prídavkom kanamycínu (80 μ g/ml).
9. Bunky sa kultivovali pri teplote 37°C, 24 – 48 hodín.

3.2.3. Príprava konštruktov a cielená mutagenéza

3.2.3.1. Príprava konštruktov pomocou In-Fusion® HD Cloning Kit

In-Fusion® HD Cloning Kit je komerčne dodávaný kit, pomocou ktorého je možné presné klonovanie jedného alebo viacerých fragmentov DNA do vektoru. Princípom metódy je spájanie fragmentov DNA (napr. generovaných PCR reakciou) s vopred pripraveným vektorom pomocou rekombinácie, 15 bp dlhých homológnych koncov.

Podľa výrobcu pomocou In-Fusion® HD Cloning Kitu je možné klonovať akýkoľvek fragment do akéhokoľvek miesta v danom vektore, so širokou škálou rôzne dlhých fragmentov. Taktiež je možné klonovať niekoľko fragmentov súčasne v jednej reakcii bez prítomnosti DNA ligázy.

1. V prvom kroku reakcie bola potrebná linearizácia vektora. Taktiež bolo nutné si pripraviť primery, ktoré obsahovali 15 bp homológnu sekvenciu s daným vektorom (na internetových stránkach firmy Clontech je program, ktorý primer navrhne za nás). Pomocou PCR boli amplifikované dva fragmenty, ktoré sa prekrývali v mieste požadovanej mutácie. Prvý fragment bol amplifikovaný pomocou primerov, kedy forward primer bol homológny so začiatkom génu a na svojom 5'konci obsahoval úsek homológny s linearizovaným vektorom. Reverse primer obsahoval bodové mutácie v požadovanej oblasti. Druhý fragment bol amplifikovaný pomocou forward primeru, ktorý obsahoval bodové mutácie v požadovanej oblasti a zároveň sa 15 nukleotidov prekrýval s reverse primerom prvého fragmentu. Druhý reverse primer bol homológny s koncom amplifikovaného génu a zároveň na svojom 5'konci obsahoval 15 nukleotidov identických s druhým linearizovaným vektorom (Obr.10a). Priebeh PCR reakcie je uvedený v tabuľke IV. a zloženie PCR reakcie je uvedené vo výsledkoch v tabuľke V.

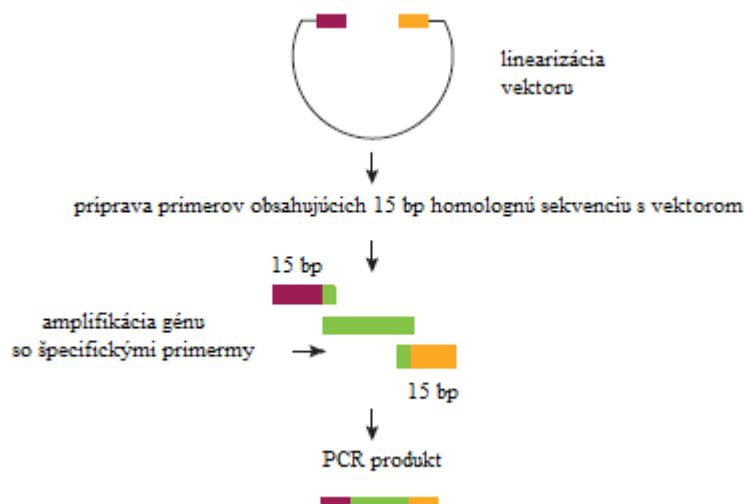
Tab. IV. – Priebeh PCR reakcie

Cyklus	Jednotlivé kroky	Teplota	Čas
	Primárna denaturácia	96°C	5 minút
Pauza	Nanesenie enzýmu	68°C	-
1. – 35.	Denaturácia	96°C	30 sekúnd
	Nasadnutie primerov	55°C	30 sekúnd
	Elongácia primerov	68°C	1 minúta
	Finálna elongácia	68°C	5 minút

Tab. V - Zloženie reakčných zmesí pre obe PCR reakcie

PCR 1	PCR 2	množstvo
Templát <i>vga</i> (A) = 20 ng/ µl	Templát <i>vga</i> (A) _{LC} = 20 ng/ µl	1 µl
Primer F – Vga-HindIII-F	Primer F – LTGAG-F	2 µl
Primer R – LTGAG-R	Primer R – Vga-BamHI-R	2 µl
dNTP	dNTP	2 µl
LA pufor	LA pufor	5 µl
LA DNA polymeráza 5 U/µl	LA DNA polymeráza 5 U/µl	1 µl
Destilovaná voda	Destilovaná voda	37 µl

Obr.10a – Príprava plazmidu a génu pre In-Fusion® HD Cloning Kit



2. Druhým krokom celej procedúry bolo odstránenie templátu z PCR reakcie.

Výrobca udáva dva spôsoby dosiahnutia žiadaného výsledku.

V prvom prípade bolo možné použiť Cloning Enhancer. K 5 µl PCR reakcie sa pridali 2 µl Cloning Enhancer a tieto dve zložky sa nechali spolu inkubovať. Najprv sa inkubovali 15 minút pri teplote 37°C, potom 15 minút pri teplote 80°C. Cloning Enhancer bolo možné podľa výrobcu kitu nahradiť pridaním DpnI enzýmu, ktorý špecifický štiepi templátovú (metylovanú) DNA

V druhom prípade sa PCR fragment o požadovanej veľkosti izoloval z gélu po elektroforetickom delení pomocou kitu Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up

System (Promega). Takto pripravenými fragmentmi bolo možné zahájiť finálny krok celého systému.

3. Tretím krokom je samotná In-Fusion® reakcia, kedy sa podľa odporúčaní výrobcu pripraví celá reakčná zmes (Tab. VI., Obr. 10b).

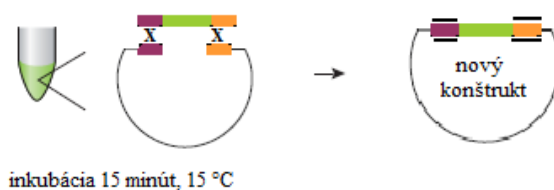
Tab. VI. odporúčané zloženie In-Fusion reakcie

Reagencie	Vzorka	Negat. kontrola	Pozit. kontrola
PCR fragment	10 – 200 ng*	-	2 µl kontrolného inzertu (2 kp)
Linearizovaný vektor	50 – 200 ng**	1 µl	1 µl pUC19 (kontrolný vektor)
5x In-Fusion HD Enzyme premix	2 µl	2 µl	2 µl
Deionizovaná voda	doplniť do 10 µl	doplniť do 10 µl	doplniť do 10 µl

* <0,5kb: 10-50ng, od 0,5 do 10 kb: 50-100 ng, >10 kb: 50-200ng

** < 10 kb: 50-100 ng, >10 kb: 50-200ng

Po namiešaní je vzorka inkubovaná 15 minút pri teplote 50°C a následne uložená do ľadu.



Obr. 10b – Vytvorenie nového konštrukt

4. Posledným krokom bola transformácia kompetentných buniek *E. coli* (Stellar™ Competent Cells (Clontech)) reakčnou zmesou. 2,5 µl reakcie sa zmiešalo s kompetentnými bunkami a nechalo sa inkubovať 30 minút na ľade. Následne boli bunky prenesené do vodného kúpeľa s teplotou 42°C a inkubované po dobu 1 minúty. Kompetentné bunky sa opäť preniesli do ľadu po dobu 1 - 2 minúty. K bunkám sa pridalo 500 µl SOC média a nechalo sa inkubovať pri teplote 37°C

po dobu 1 hodiny. Následne boli bunky po centrifugácii rozočkované na LB agar so selekčným antibiotikom a kultivované do nasledujúceho dňa pri teplote 37°C.

3.2.3.2. Cílená mutagéniza pomocou QuikChange™ (Promega)

Pomocou QuikChange™ metódy bolo možné pripraviť bodové mutácie, ktorých výsledkom bola zámena aminokyselín v polypeptidovom reťazci. Túto metódu je možné použiť aj na prípravu delécií resp. inzercii jednej alebo viacerých aminokyselín.

Aminokyselinové zámény v proteíne boli pripravované podľa návodu komerčnej súpravy QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit, ale s použitím vlastných enzýmov. Princípom bolo zainkorporovanie komplementárnych oligonukleotidov nesúcich požadované mutácie do sekvencie génu vloženého vo vektore. Použitím vysoko špecifickej polymerázy (Phusion® High-Fidelity DNA polymeráza) dochádzalo k predlžovaniu oligonukleotidov. Takto bol amplifikovaný celý gén spolu s vektorom. Po ukončení PCR bol do reakcie pridaný DpnI (enzým rozlišujúci metylovanú DNA v pozícií 5'-G(6mA)TC-3'), kedy dochádzalo k rozštiepeniu metylovanej DNA, produkt PCR nebol metylovaný a preto nebol štiepený. Následne bola zmes de novo syntetizovaných plazmidov s génom (s objemom 10 µl) transformovaná do XL1-Blue kompetentných buniek. Zloženie reakčnej zmesi a priebeh PCR reakcie je uvedený v tabuľke VII. a tabuľke VIII.

Tab. VII. – Zloženie PCR reakčnej zmesi na miestne špec. mutagénizu

Komponenty	Množstvo na 1 reakciu
5 x Phusion GC pufor	10 µl
Templát (20ng/ µl)	1 µl
Primer forward (125ng)	1 µl
Primer reverse (125 ng)	1 µl
dNTP mix (10 mM)	1 µl
Phusion® High-Fidelity DNA polymeráza 2 U/ µl	1,25 µl
Destilovaná voda	34,75 µl

Tab. VIII. Priebeh prípravy mutovaného plazmidu

Cyklus	Teplota	Čas
1.	95°C	5 minút
Pauza, polymeráza 1, 25 µl	68°C	-
2. – 18.	95°C	30 sekúnd
	56°C	1 minúta
	72°C	3 minúty
Pauza, DpnI – 0,75 µl	14°C	-
	37°C	1 hodina
	80°C (inaktivácia DpnI)	20 minút

3.2.4. Izolácia DNA

Plazmidová DNA bola izolovaná pomocou komerčne dostupných súprav. Izolácia celkovej DNA zo stafylokokov je popísaná v nasledujúcej kapitole.

3.2.4.1. Izolácia celkovej DNA zo stafylokokov

1. Do 5 ml BHF bujónu s prídavkom 1% glycínu bola zaočkovaná kolónia baktérie *S. aureus* RN4220 obsahujúca plazmid s vloženým génom a nechala sa kultivovať 16-18 hodín pri teplote 37°C v trepačke pri otáčkach 200 RPM.
2. Na druhý deň sa bakteriálna kultúra 10 minút zcentrifugovala pri 4500 RPM a supernatant sa odstránil.
3. Sediment bol resuspendovaný v 250 µl TES pufrí a bolo pridaných 25 µl lyzozýmu (20 mg/ml) a 25 µl lyzostafínu (1 mg/ml). Celá zmes bola inkubovaná pri teplote 37°C 1 hodinu.
4. Bunky boli opäť zcentrifugované pri 13 000 RPM po dobu 5 minút a supernatant sa odstránil.
5. Sediment bol resuspendovaný v 1 ml Cell Lysis Müller pufrí a k suspenzii bolo pridaných 70 µl SDS (10%), 20 µl proteinázy K (20 mg/ml) a 20 µl ribonukleázy A (20mg/ml) a celá zmes bola inkubovaná pri teplote 55°C po dobu 1 hodiny (bunky boli lýzované a došlo k prečisteniu suspenzie).

6. Po inkubácii bola zmes schladená na laboratórnu teplotu a bolo pridaných 333 μ l nasýteného roztoku NaCl a celý objem bol vortexovaný (mliečny zákal – čo svedčilo o výzražení proteínov).
7. Celá zmes bola opäť centrifugovaná 30 minút pri 13 000 RPM a supernatant sa prepipetoval do čistej mikroskúmavky.
8. K 1 ml supernatantu bolo pridaných 0,7 ml izopropanolu a celá zmes sa zvortexovala (došlo k precipitácii DNA) a centrifugovala 15 minút pri 13 000 RPM. Izopropanol sa následne odstránil.
9. Sediment sa premyl 500 μ l etanolu (70%) a opäť sa centrifugoval pri 13 000 RPM po dobu 5 minút (tento krok zabezpečil odstránenie soli).
10. Po centrifugácii bol etanol odstránený a vzorka sa nechala vysušiť.
11. Po vysušení bola vzorka resuspendovaná v 100 μ l TE⁻¹ pufri s prídavkom 5 μ l ribonukleázy A a nechala sa rozpúšťať 30 minút pri teplote 55°C (alternatívou bolo rozpúšťanie pri 4°C cez noc).

3.2.5. Štiepenie DNA fragmentov pomocou restričných endonukleáz

Restričné endonukleázy rozpoznávajú dsDNA, ktorú dokážu štiepiť vo vnútri vlákna v danom špecifickom mieste.

Pri práci s restričnými endonukleázami bolo postupované podľa doporučení výrobcu (New England Biolabs). Restričné endonukleázy boli používané na subklonovanie génu a jeho mutovaných variant (Tab. IX.), ďalej pre overenie správnosti vložených fragmentov alebo pre overenie prítomnosti mutácii (Tab. X.).

Tab.IX. – zloženie reakčnej zmesi pre restrikciu mutovaného génu

Zloženie reakčnej zmesi	Množstvo na 1 reakciu
NEB pufor (10 x koncentrovaný)	1/10 celkového množstva
Restričná endonukleáza*	30 U
Plazmidová DNA	10 μ g
Destilovaná voda	doplniť do objemu 200 μ l

* teplota a pufor použitý pri jednotlivých restričných analýzach je uvedený v kapitole 3.1.6. Enzýmy

- čas inkubácie celej reakčnej zmesi bol 1,5 až 2 hodiny.

- po restriktčnom štiepení nasledovala elektroforéza na overenie správnosti vyštiepovaného fragmentu a izolácia z gélu.

Tab. X. – zloženie reakčnej zmesi pre kontrolnú restriktčnú analýzu

Zloženie reakčnej zmesi	Množstvo na 1 reakciu
NEB pufor (10 x koncentrovaný)	1/10 celkového množstva
Restriktčná endonukleáza*	10 U
Plazmidová DNA	4 µg
Destilovaná voda	doplniť do objemu 20 µl

* použité restriktčné endonukleázy – Hind III, BspI, BspFI

* teplota a pufor použitý pri jednotlivých restriktčných analýzach je uvedený v kapitole 3.1.6. Enzýmy

- čas inkubácie celej reakčnej zmesi bol 1,5 až 2 hodiny.
- po restriktčnom štiepení nasledovala elektroforéza na overenie správnosti vyštiepovaného fragmentu.

3.2.6. Ligácia restriktčných fragmetov DNA do pRB374

Ligáciou sa rozumie spájanie dvoch alebo viacerých fragmentov molekuly DNA, resp. cirkularizácia lineárnych fragmentov DNA.

Objem ligáčnej reakcie bol 20 µl. Medzi inzertom a vektorom bol dodržiavaný molárny pomer 3:1. Ligáčnu reakciu katalyzovala T4 DNA ligáza od firmy Fermentans (1 Weiss U / µl) v prostredí odpovedajúceho ligáčneho pufru. Do ligáčnej reakcie bol pridávaný ATP v konečnej koncentrácii 1 mM. Zvyšný objem bol doplnený destilovanou vodou. Celá reakčná zmes bola inkubovaná pri teplote 4°C po dobu 18 hodín. Následne bol celý reakčný objem použitý na transformáciu kompetentných buniek *E. coli JM109*.

3.2.7. Polymerazová reťazová reakcia

Polymerazová reťazová reakcia označovaná ako PCR (Polymerase Chain Reaction) je metóda molekulárnej biológie, ktorá slúži na amplifikáciu DNA molekúl in vitro využívajúc enzým DNA-polymerázu. Všetky PCR reakcie prebiehali v objeme 50 µl.

- Amplifikácia *vga(A)* s kotvou

Pomocou PCR boli pripravené viaceré varianty génov kódujúcich *Vga(A)* proteín fúzovaný s proteínovou kotvou. K amplifikácii *vga(A)* génu dochádzalo pomocou použitia špecifických primerov, ktoré obsahovali vo svojej sekvencii aj sekvenciu pre proteínovú kotvu. Zloženie PCR reakcie je uvedené v tabuľke XI. a priebeh PCR reakcie je uvedený v tabuľke XII.

Tab. XI. – Zloženie PCR reakcie

Komponenty	Množstvo na 1 reakciu
Templát 20 ng/ μ l	1 μ l
Primer F	2 μ l
Primer R	2 μ l
dNTP	2 μ l
5 x Phusion GC pufor	10 μ l
Phusion® High-Fidelity DNA polymeráza 2 U/ μ l	1,25 μ l
Destilovaná voda	31,75 μ l

Tab. XII. - priebeh PCR reakcie

Cyklus	Jednotlivé kroky	Teplota	Čas
	Primárna denaturácia	95°C	2 minúty
Pauza	Nanesenie enzýmu	68°C	-
1. – 35.	Denaturácia	95°C	30 sekúnd
	Nasadnutie primerov	56°C	45 sekúnd
	Elongácia primerov	72°C	1,5 minúty
	Finálna elongácia	72°C	5 minút

- PCR pre overenie správnosti elektroporácie

Polymerazová reťazová reakcia bola používaná aj na overenie správnosti elektroporácie plazmidu pRB374 a jednotlivých inzertov. Zloženie celej reakčnej zmesi je uvedené v tabuľke XIII. a celkový priebeh PCR reakcie je znázornený v tabuľke XIV. Ako templát do PCR reakcie bola používaná izolovaná celková DNA.

Tab. XIII. – Zloženie PCR reakčnej zmesi

Komponenty	Množstvo na 1 reakciu
Templát	4 µl
LA pufor	5 µl
dNTP (10 mM)	2 µl
Primer forward (10pM)	2 µl
Primer reverse (10pM)	2 µl
LA DNA polymeráza mix 5 U/µl	0,5 µl
Destilovaná voda	34,5 µl

Tab. XIV. – Priebeh PCR

Cyklus	Jednotlivé kroky	Teplota	Čas
	Primárna denaturácia	95°C	2 minúty
Pauza	Nanesenie enzýmu	68°C	-
1. – 35.	Denaturácia	95°C	30 sekúnd
	Nasadnutie primerov	50°C	45 sekúnd
	Elongácia primerov	68°C	1,5 minúty
	Finálna elongácia	68°C	5 minút

3.2.8. Elektroforéza DNA v agarózovom gély

Agarózova elektroforéza patrí medzi jednoduché a pomerne rýchle metódy na analýzu veľkosti DNA fragmentov, ktoré je možné v prípade potreby po separácii taktiež vyizolovať. Medzi výhody patrí priama detekcia fragmentov DNA v ultrafialovom svetle, pomocou farbenia s fluorescenčnými interkalačnými látkami. Rýchlosť pohybu fragmentov v agarózovom gély závisí od molekulovej hmotnosti DNA, koncentrácie agarózového gélu, konformácie DNA, veľkosti použitého napätia, od zloženia elektroforetického roztoku a teploty.

V experimentálnej časti bol používaný agarózový gél pripravovaný v 1x TAE pufri. Koncentrácia agarózového gélu bola volená podľa veľkosti analyzovaných

fragmentov, od 0,8 % do 1 %. Do gélu bol pridávaný roztok ethidium bromidu o konečnej koncentrácii 0,005%, za účelom vizualizácie DNA pod UV svetlom. Pred nanesením bol ku vzorku pridaný 10x koncentrovaný vzorkový pufor. Fragменты boli separované pri konštantnom napätí 3 – 5 V/cm.

3.2.9. Sekvenovanie DNA

Sekvenovanie bolo prevádzané v spoločnosti MacroGen (Korea). Vzorky boli dodávané vo forme plazmidovej DNA o koncentrácií 40 – 100 ng/ μ l a vo forme PCR produktu o koncentrácií 20 – 50 ng/ μ l. Sekvencie boli vyhodnocované v programe Geneious Pro 5.5.6.

3.2.10. Stanovovanie citlivosti na antimikróbne látky

Existujú dve základne metódy stanovenia citlivosti. Dilučná metóda je založená na kultivácii s postupne sa zvyšujúcou koncentráciou antibiotika, ktorej výsledkom je stanovenie minimálnej inhibičnej koncentrácie. Difúzna metóda spočíva v difúzii antibiotika do kultivačnej pôdy. V pôde sa následne vytvorí koncentračný gradient difundovaného antibiotika, ktorej výsledkom je vytvorenie inhibičnej zóny. Pri tejto metóde sa meria veľkosť inhibičnej zóny. Na to aby boli výsledky stanovenia citlivosti na antimikróbne látky reprodukovateľné, bolo potrebné štandardizovať kultivačné podmienky a zákal inokula podľa stupnice McFarland.

3.2.10.1. Príprava inokula

Na prípravu inokula boli používané bakteriálne kolónie narastené na NYE agare s prídavkom 80 μ g/ml kanamycínu v prípade, že kmene obsahovali plazmid pRB374 a jeho deriváty. Kolónie neboli staršie ako 24 hodín.

Inokulum testovaného kmeňa bolo pripravené resuspendovaním kolónie v 2 ml fyziologického roztoku na výsledný zákal 1 McFarland. Takto pripravené inokulum sa používalo na testovanie citlivosti diskovou difúznou metódou a na stanovovanie minimálnej inhibičnej citlivosti agarovou dilučnou metódou.

Zákalové štandardy boli pripravené podľa Urbáškovvej (1997) tak ako je uvedené v tabuľke XV. Každý štandard bol pripravený v objeme 5 ml v rovnakých skúmavkách, ktoré boli používané na prípravu inokula pri testovaných kmeňov.

Tab. XV. – Príprava zákalových štandardov McFarlanda

McFarland	Pridaný objem jednotlivých roztokov		Približne zodpovedajúci počet buniek / ml
	BaCl ₂ (1,175%)	H ₂ SO ₄ (1%)	
0,5	0,5 ml	99,5 ml	1,5 x 10 ⁸
1	1,0 ml	99 ml	3,0 x 10 ⁸
2	2,0 ml	98 ml	6,0 x 10 ⁸

3.2.10.2. Disková difúzna metóda

Diskovou difúznou metódou sa stanovuje citlivosť baktérií podľa veľkosti inhibičnej zóny v okolí disku.

Pri očkovaní inokula na platňu s Mueller-Hinton agarom treba dávať pozor aby platne neobsahovali kvapky kondenzovanej vody. Tomu je možné zabrániť pootvorením platne a krátkym osušením. Inokulum je nutné do 15 minút od prípravy rozočkovať na pripravenú pôdu.

1. Pripravené inokulum o zákale 1 McFarland bolo môže naniest' na kultivačnú pôdu dvoma spôsobmi. Inokulum bolo možné očkovať na kultivačnú pôdu rozterom. Sterilný tampón bol ponorený do bakteriálnej suspenzie a odstránila sa prebytočná suspenzia z vatového tampónu (mierny tlak na stenu skúmavky). Tampón bol rozočkovaný na platňu v troch smeroch, ktoré zvierajú uhol 60° a následne sa inokulum rozotrela po celej ploche agaru. Nakoniec sa tampónom obkrúžil aj okraj agaru.

Druhý spôsob spočíval v preliatí suspenzie na povrch agaru a nakláňaním pôdy na všetky strany, čím bolo umožnené rozočkovanie celého povrchu kultivačnej pôdy. Prebytočné inokulum sa pipetou odsalo a pôda sa nechala krátko osušiť. Pri tejto metóde boli okraje inhibičných zón ostrejšie než pri inokulácií rozterom.

2. Na pôdu boli pomocou ihly umiestnené jednotlivé antibiotické disky pričom vzdialenosť disku od okraja platni a vzdialenosť jednotlivých diskov od seba musela byť približne 25 mm. Disky sa jemne pritlačili na povrch platne. Bolo potrebné dávať pozor na to aby celá plocha disku bola v kontakte s pôdou.
3. Takto pripravené kultivačné pôdy sa spolu s antibiotickými diskami nechali kultivovať 18 – 24 hodín pri teplote 37°C. Po kultivácii sa odčítavali priemery

inhibičných zón. Na priehľadných pôdach sa meral priemer inhibičných zón v prechádzajúcom svetle.

4. Ako kontrolný kmeň pre stanovovanie citlivosti sa používal *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, ktorý musel dávať veľkosť inhibičnej zóny uvedený v tabuľke XVI.

Tab. XVI. – Hraničný priemer inhibičných zón pre citlivý kmeň

<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	
Antibiotikum	Prípustné priemery inhibičných zón (mm)
Erytromycín (15 µg)	22 - 30
Klindamycín (2 µg)	24 - 30

Okrem komerčne dostupných diskov bolo možné pripraviť si v laboratóriu aj vlastné disky. Jeden disk s priemerom 6 mm pojme maximálne 25 µl roztoku. Aby sme zistili aké je optimálne množstvo antibiotika v disku bolo nutné si pripraviť disky s rôznym množstvom antibiotika a otestovať na citlivom kmeni, ako veľké boli vytvorené inhibičné zóny. Pre ďalšie testovanie bolo zvolené to množstvo antibiotika, ktoré udávalo optimálnu inhibičnú zónu (25 – 30 mm).

Príprava disku spočívala v napipetovaní antibiotika na disk a odparení rozpúšťadla. Takto pripravené disky s antibiotikom boli uskladnené pri teplote – 20°C.

Výpočet: Príprava disku s 30 µg pristinamycínu IIA

Nutné vypočítať koncentráciu antibiotika v 1 µl roztoku.

$$X = \frac{30}{25} ; X = 1,2 \text{ µg/µl}$$

V prípade, že na disk nanesieme 25 µl pristinamycínu IIA o koncentrácii 1,2 µg/µl, po odparení rozpúšťadla nám v disku ostane 30 µg pristinamycínu IIA.

3.2.10.3. Agarová dilúčna metóda

Testovanie citlivosti agarovou dilúčnou metódou bolo prevádzané na miskách, ktoré obsahovali Mueller-Hinton agar s príslušnou koncentráciou antibiotika (klindamycín, linkomycín a pristinamycín IIA) pripravené podľa nasledujúceho postupu:

1. Presným navážením antibiotika bola pripravená počiatočná koncentrácia 10 mg/ml.
2. Podľa tabuľky XVII. sa pripravili jednotlivé pracovné koncentrácie antibiotík s objemom 2 ml v 50 ml sterilných kónických skúmavkách.
3. K pripravenému antibiotiku sa za sterilných podmienok pridalo 18 ml Mueller-Hinton agaru vytemperovaného na 55°C a dôkladne sa celá zmes premiešala.
4. Takto pripravený agar so špecifickou koncentráciou antibiotika sa vylial na petriho misku s priemerom 8 cm.
5. Pripravené kultivačné pôdy sa ponechali v laminárnom boxe aby došlo k zatuhnutiu agaru a čiastočnému vysušeniu platní (platňa na povrchu musí byť suchá, bez stôp kondenzovanej vody).
6. Po pripravení inokúl jednotlivých baktérii bola časť objemu prepipetovaná do mikrotitračnej platničky v určitom poradí.
7. Následne bola suspenzia o objeme 5 µl prepipetovaná na povrch platne pomocou multikanálovej pipety.
8. Inokulum bolo najprv napipetované na pôdu bez antibiotika a následne bolo pipetované na pôdy so stúpajúcou koncentráciou antibiotík. Pri každom pipetovaní bolo inokulum opatrne premiešané, aby sa zabránilo sedimentácii buniek.
9. Pre každé antibiotikum bolo inokulum napipetované do nových jamiek v mikrotitračnej platničke a odtiaľ bolo pipetované na pôdy.
10. Po nanesení bakteriálnych kultúr boli platne s inokulom vysušené v laminárnom boxe a následne kultivované v termostate pri teplote 37°C po dobu 24 hodín.
11. Po 24 hodinách boliisky hodnotené. Za minimálnu inhibičnú koncentráciu antibiotika bola považovaná tá najmenšia koncentrácia antibiotika, ktorá inhibovala rast bakteriálnej suspenzie napipetovanej na pôde.

Tab. XVII. Riedenie antibiotík

Počiatočná koncentrácia antibiotika (mg/ml)	ATB (μ l)	Dest. voda (μ l)	Pracovná koncentrácia (μ g/ml)	Agar (ml)	Konečná koncentrácia (μ g/ml)	Log ₂ koncentrácia
			10 mg/ml			
10 mg/ml	128	872	1280	9	128	7
10 mg/ml	64	936	640	9	64	6
10 mg/ml	140	1260	1 mg/ml			
1 mg/ml	320	680	320	9	32	5
1 mg/ml	160	840	160	9	16	4
1 mg/ml	80	920	80	9	8	3
1 mg/ml	40	960	40	9	4	2
1 mg/ml	20	980	20	9	2	1
1 mg/ml	32	3168	0,01 mg/ml			
0,1 mg/ml	1000	-	10	9	1	0
0,1 mg/ml	500	500	5	9	0,5	-1
0,1 mg/ml	250	750	2,5	9	0,25	-2
0,1 mg/ml	125	875	1,25	9	0,125	-3
0,1 mg/ml	62,5	937,5	0,625	9	0,0625	-4

Pozn.: Pracovná koncentrácia pristinamycínu IIA bola pripravovaná v metanole (nízka rozpustnosť antibiotika vo vode). Pracovná koncentrácia linkomycínu a klindamycínu bola pripravovaná v sterilnej destilovanej vode.

4. Výsledky

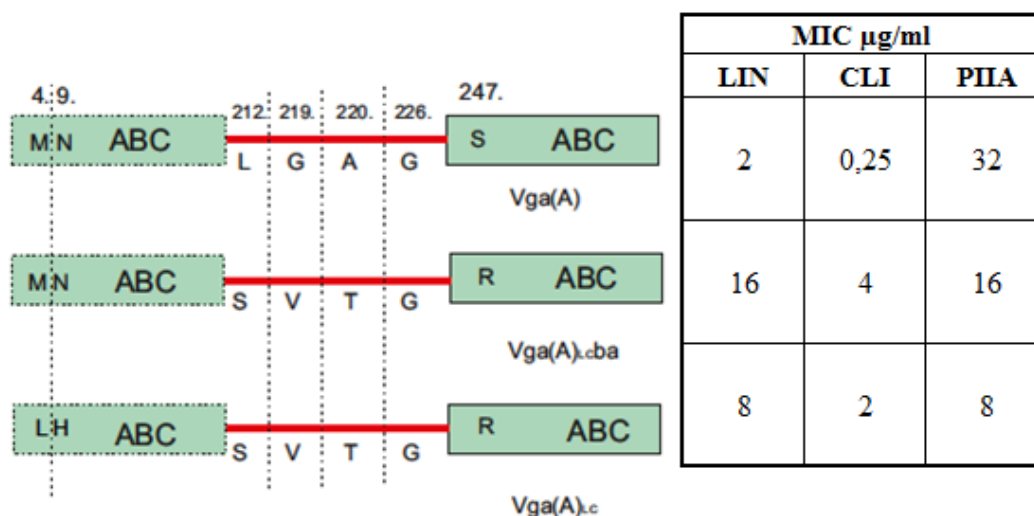
4.1. Porovnanie vplyvu aminokyselinovej variability Vga(A)

a Vga(A)_{LC} na schopnosť udeľovať rezistenciu k linkozamidom

Proteín Vga(A) a jeho varianta Vga(A)_{LC} sú identické z 98,7 %. Oba proteíny sa medzi sebou iba líšia v 7. aminokyselinách: M4L (metionín v 4. pozícii je u Vga(A)_{LC} zamenený za leucín), N9H, L212S, G219V, A220T, G226S a S247R. Kombinácia aminokyselinových zvyškov LGAG v pozícii 212, 219, 220 a 226 je charakteristická pre Vga(A) proteín a je zodpovedná za vysoký stupeň rezistencie na streptogramíny a nízky stupeň rezistencie na linkomycín. Vga(A)_{LC} proteín obsahuje kombináciu aminokyselinových zvyškov SVTS, ktoré sú zodpovedné za vysokú rezistenciu k linkomycínu a klindamycínu a nízku rezistenciu k streptogramínom. Tieto aminokyseliny sú súčasťou linkeru spájajúceho dve ABC domény daného proteínu. Tento úsek polypeptidového reťazca kde dochádza k najväčšej aminokyselinovej variabilite je dlhý len 15 aminokyselín (Novotná, 2006).

Základom experimentálnej časti predloženej diplomovej práce bolo vytvorenie nových Vga(A) variant, ktoré obsahujú všetky kombinácie aminokyselín špecifických pre Vga(A) a Vga(A)_{LC} proteín v pozíciách 212, 219, 220 a 226 a porovnanie ich schopnosti udeľovať rezistenciu k linkozamidom. Za vhodné pozadie, v ktorom boli mutácie v linkeru testované bol zvolený hybridný proteín Vga(A)_{LCba}, ktorý má substrátovú špecifitu zhodnú s Vga(A)_{LC} proteínom (udeľuje rezistenciu k linkozamidom a streptogramínom), navyše je však dvakrát tak účinnejší (Obr. 11) (NOVONA, JANATA, 2006). Vga(A)_{LCba} proteín je identický s Vga(A) proteínom v 4. a 9. pozícii.

Obr. 11 Porovnanie Vga(A), Vga(A)_{LCba} a Vga(A)_{LC} proteínu(NOVONA, JANATA, 2006).



4.1.1. Príprava konštruktov exprimujúcich Vga(A) mutanty a ich transformácia do citlivého kmeňa *S. aureus* RN4220

Aminokyselinové zámény v proteíne Vga(A)_{LCba} boli pripravované podľa návodu komerčnej súpravy QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit, ale s použitím vlastných enzýmov.

Ako templát pre cielenú mutagénzu bol použitý konštrukt pJAKO nesúci gén pre hybridný proteín Vga(A)_{LCba}. Hlavným dôvodom použitia vektora pJAKO bola jeho relatívne malá veľkosť (2,96 kb). Primery nesúce požadované mutácie boli zainkorporované za použitia Phusion® High-Fidelity DNA polymerázy (zoznam mutačných primerov je uvedený v kapitole 3.1.5. a presný postup a zloženie reakčnej zmesi je uvedený v kap. 3.2.3.2. Niektoré oligonukleotidy obsahovali taktiež tzv. tiché mutácie vytvárajúce restričné miesto, ktoré umožňuje detekciu mutovaných konštruktov pomocou restričnej analýzy.

Po prebehnutí reakcie bol do reakčnej zmesi pridaný enzým DpnI, čím došlo k naštípeniu templátovej metylovanej DNA. Amplifikovaná nemetylovaná DNA nesúca mutáciu bola transformovaná do superkompetentných buniek *E. coli* XL1-Blue. Po transformácii boli bunky vysiate na LB agar s prídavkom karbenicilínu (100 $\mu\text{g/ml}$) a kultivované cez noc pri teplote 37°C. Pokiaľ pre mutagénzu boli použité primery

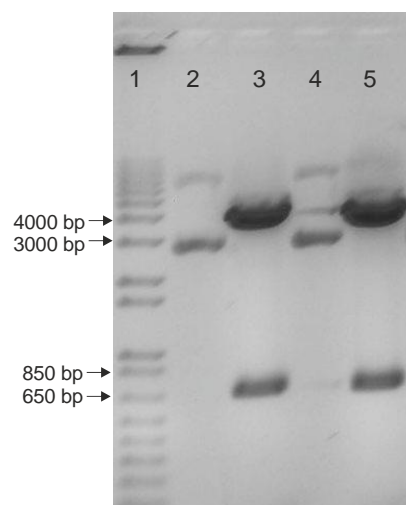
s tichými mutáciami boli narastené kolónie pomnožené v LB bujóne s prídavkom karbenicilínu (100 µg/ml) a následne bola vyizolovaná plazmidová DNA, ktorá bola analyzovaná restriktčnými enzýmami. Pri kontrolnom štiepení boli používané enzýmy HindIII, BlnI a BsrFI v rôznych kombináciach (Tab. XVIII.). Príklady restriktčnej analýzy konštruktov so správnymi mutáciami sú ukázané na obrázkoch 12 a 13.

Tab. XVIII. - Očakávané veľkosti fragmentov po kontrolnom štiepení

konštrukt	restriktčné enzýmy	očakávané veľkosti fragmentov (bp)
pJAKO:: <i>vga</i> (A) _{LCba} .LGAS	BlnI, HindIII	3888, 689, 32
pJAKO:: <i>vga</i> (A) _{LCba} .SVAS	BlnI, HindIII	3888, 717
pJAKO:: <i>vga</i> (A) _{LCba} .SVTG	BsrFI, Hind III	2351, 1167, 732, 364
pJAKO:: <i>vga</i> (A) _{LCba} .SGAG	BsrFI, HindIII	2351, 1167, 732, 364

Obr.12. – Kontrolná restrikcia enzýmami BlnI,
HindIII

1. štandard;
 2. pJAKO.*vga*(A)_{LCba}.LGAS;
 3. pJAKO.*vga*(A)_{LCba}.LGAS – štiepený BlnI,HindII;
 4. pJAKO.*vga*(A)_{LCba}.SVAS;
 5. pJAKO.*vga*(A)_{LCba}.SVAS – štiepený BlnI, HindIII
- Delenie prebiehalo v 1% agarozóvom gély.



Obr. 13. - Kontrolná restrikcia enzýmom

BsrFI a Hind III

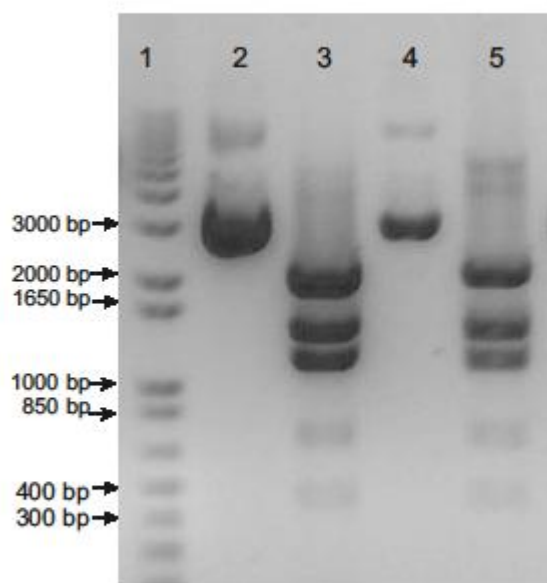
1. štandard;
2. pJAKO.vga(A)_{LCba}.SVTG;
3. pJAKO.vga(A)_{LCba}.SVTG – štiepený

BsrFI, HindIII*;

4. pJAKO.vga(A)_{LCba}.SGAG;
5. pJAKO.vga(A)_{LCba}.SGAG – štiepený

BsrFI, HindIII

* fragment, ktorý sa nachádza medzi fragmentami o dĺžke 2351 bp a 1167 bp vznikol nedokonalým štiepením fragmentu o dĺžke 1531 bp enzýmom BsrFI. Delenie prebiehalo v 1% agarozóvom gély.



V prípade pozitívnej restrikčnej analýzy bola správnosť sekvencie mutovaného génu ďalej overená sekvenáciou pomocou primerov M13F, M13R, VgaK2F.

Prítomnosť mutácií u konštruktov (pJAKO::vga(A)_{LCba}.LGTS, pJAKO::vga(A)_{LCba}.SGTS, pJAKO::vga(A)_{LCba}.SGTG) nebolo možné overiť restrikčnou analýzou, pretože mutačné primery neobsahovali tichú mutáciu vytvárajúcu restrikčné miesto. Prítomnosť mutácií bola u týchto konštruktov overované priamo sekvenáciou plazmidovej DNA vyizolovanej z náhodných klonov po úspešnej transformácii. Najprv bol použitím primeru VgaK2F osekvenovaný mutovaný úsek génu a v prípade pozitívneho výsledku bola dodatočne dosekvenovaná zvyšná časť génu pomocou primerov M13F a M13R. Toto opatrenie bolo zvolené z dôvodu šetrenia nákladov spojených so sekvenovaním konštruktov.

Mutovaný gén bol po osekvenovaní preklonovaný do kyvadlového vektoru pRB374 umožňujúci expresiu v *Staphylococcus aureus* RN4220. Fragment o veľkosti 1666 bp obsahujúci vga(A)_{LCba} s požadovanými mutáciami bol vyštiepený z pJAKO restrikčnými enzýmami BamHI a EcoRI. Po separácii fragmentu a jeho izolácii z agarozového gélu bol fragment ligovaný do pRB374, ktorý bol linearizovaný rovnakými restrikčnými enzýmami. V niektorých prípadoch bola preklonovaná iba časť mutovaného génu a to s použitím enzýmov BsaBI a XbaI. Fragment o veľkosti 424 bp,

obsahujúci mutovanú časť génu bol opäť po separácii vyizolovaný z agarozového gélu a ligovaný do konštruktu pRB374::*vga(A)*_{LCba}, ktorý bol linearizovaný rovnakými restriktívnymi enzýmami. Všetky takto pripravované konštrukty sú uvedené v tabuľke XIX.

Označenie kombinácie mutácií	Použitý vektor	Zámena jednotlivých aminokyselín vo <i>vga(A)</i> _{LCBA} géne (čísla udávajú pozíciu aminokyseliny)				Restriktčné enzýmy používané k restrikcii	Dĺžka ligovaného fragmentu
		212	219	220	226		
L G T S	pRB374. <i>vga(A)</i> _{LCba}	L	G	T	S	BsaBI, XbaI	424 bp
L G A S	pRB374	L	G	A	S	BamHI, EcoRI	1666 bp
S V T G	pRB374. <i>vga(A)</i> _{LCba}	S	V	T	G	BsaBI, XbaI	424 bp
S G A G	pRB374. <i>vga(A)</i> _{LCba}	S	G	A	G	BsaBI, XbaI	424 bp
S V A S	pRB374	S	V	A	S	BamHI, EcoRI	1666 bp
S G T G	pRB374	S	G	T	G	BamHI, EcoRI	1666 bp
S G T S	pRB374	S	G	T	S	BamHI, EcoRI	1666 bp

Tab. XIX – Zoznam vytvorených mutácií a spôsob klonovania do pRB374

Pozn.: Červenou farbou sú označené aminokyseliny proteínu Vga(A), zelenou farbou sú označené aminokyseliny proteínu Vga(A)_{LC}.

Konštrukt pRB374::*vga(A)*_{LCba}.LVTS bol pripravený z konštruktu Vga(A)_{LC}xaLVTS, ktorý pripravila v minulosti Michaela Kroová ako súčasť svojej diplomovej práce. Restrikciou pomocou enzýmov BsaBI a XbaI bol vyizolovaný z pôvodného konštruktu fragment o dĺžke 424 bp, ktorý bol následne použitý do ligáčnej reakcie.

Ligáčna reakcia prebiehala za dvoch rôznych teplotných podmienok, inkubáciou po dobu jednej hodiny pri laboratórnej teplote a jednak po dobu 18 hodín pri teplote 4°C. Lepšieho výsledku sa dosahovalo pri inkubácii, ktorá trvala 18 hodín pri teplote 4°C, keďže nárast pozitívnych kolónii bol vyšší ako pri inkubácii po dobu jednej hodiny pri laboratórnej teplote.

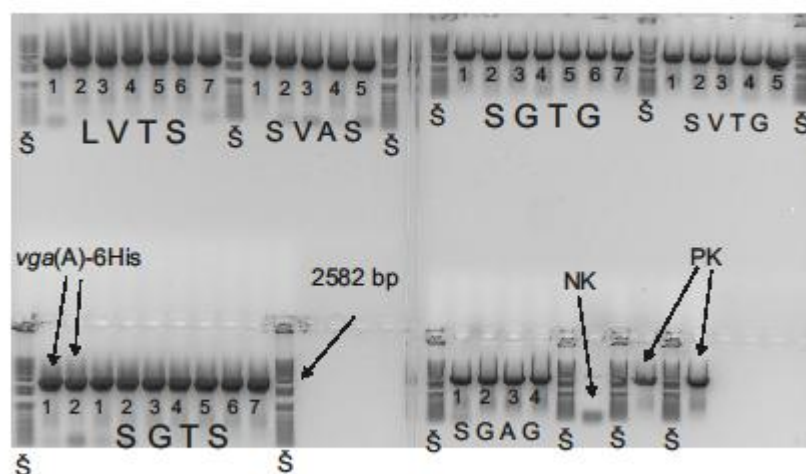
Ligačná zmes bola transformovaná do *E.coli* JM109 a vysiata na LB agar obsahujúci kanamycín (80 µg/ml). Jednotlivé kolónie boli na druhý deň zaočkované do LB média a po pomnožení buniek bola vyizolovaná plazmidová DNA, ktorá bola použitá pre kontrolnú restriktívnu analýzu. Použitie restriktívnych enzýmov bolo identické s restriktívnymi enzýmami, ktoré boli použité pri klonovaní (po restrikcii veľkosť

fragmentov v elektroforézovom gély musela byť identická s dĺžkou ligovaného fragmentu). V prípade pozitívneho výsledku bola časť plazmidu spolu s vloženým génom overená sekvenovaním pomocou primerov pRB374 F, pRB374 R a VgaK2F. Pre transformáciu do *S. aureus* RN4220 bolo nutné pripraviť nemetylovanú DNA. Nemetylovaná plazmidová DNA bola pripravená transformáciou a izoláciou plazmidu z nemetylujúceho kmeňa *E. coli* GM2929.

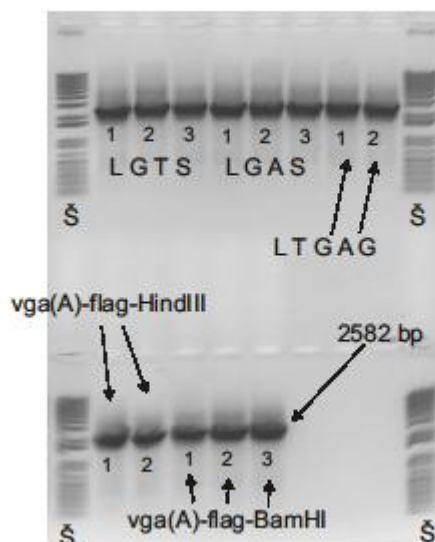
Konštrukty pRB374 nesúce mutované *vga(A)* gény boli transformované elektroporáciou do citlivého bakteriálneho kmeňa *S. aureus* RN4220. Po elektroporácii boli bunky vysiate na NYE platne s prídavkom kanamycínu (80 µg/ml) a kultivované 48 hodín pri teplote 37°C.

Prítomnosť konštruktu v *S. aureus* RN4220 bola po transformácii overená pomocou PCR. Na začiatku bola používaná metóda kolóniovej PCR avšak táto metóda sa ukázala ako nevhodná, pretože veľmi často dochádzalo k falošne negatívnym výsledkom. Nedochádzalo k amplifikácii fragmentu u kolónii, ktoré prekazateľne obsahovali transformovaný plazmid. Dôvodom je pravdepodobne silná bunková stena *S. aureus*, prípadne prítomnosť inhibítorov PCR reakcie v bunkovom lyzáte. Aj napriek niekoľkým modifikáciám sa nepodarilo metódu optimalizovať a tak bolo nutné ako templát použiť celkovú DNA izolovanú z príslušných transformantov. Pre amplifikáciu mutovaného *vga(A)*_{LCba} boli použité primery pRB374 F a pRB374 R, ktoré sú špecifické pre plazmid pRB374 v miestach inzercie génu (obrázok 14a a 14b). Pokiaľ bunky obsahovali transformovanú plazmidovú DNA, produktom PCR reakcie bol fragment o veľkosti približne 2,6 kb.

Aj napriek tomu, že v porovnaní s kolóniovým PCR je izolácia celkovej DNA pomerne zdĺhavý a prácny proces, úspešnosť amplifikácie génu je viac ako 95%. Takto pripravené bakteriálne kmene exprimujúce varianty proteínu Vga(A) nesúce rôzne kombinácie aminokyselín boli použité na testovanie citlivosti k linkozamidovým a streptogramínovým antibiotikám.



Obr. 14a – Overenie prítomnosti velktoru v *S. aureus* RN4220 pomocou PCR



Obr. 14b – Overenie prítomnosti velktoru v *S. aureus* RN4220 pomocou PCR

Pozn. Na obrázkoch 14a a 14b sú číslami označené jednotlivé kolónie pre danú mutáciu (napr. obr. 14a je číslami 1 až 7 označené poradie analyzovaných kolónií, ktoré obsahujú mutáciu LVTS v géne *vga(A)*_{LCba}). Š je označenie pre štandard veľkosti DNA, NK – negatívna kontrola, PK – pozitívna kontrola (ako pozitívna kontrola bol používaný konštrukt pRB374.*vga(A)*_{LCba}.LTGAG, ktorý bol do PCR reakcie pridávaný o koncentrácii 20 ng/μl).

4.1.2. Testovanie citlivosti k linkozamidom a streptogramínom

Pre testovanie citlivosti k antibiotikám sa používajú dva základné prístupy, agarová dilúčna metóda a disková difúzna metóda (kapitoly 3.2.10.2. a 3.2.10.3.). Pre testovanie transformantov *S. aureus* RN4220 nesúcich Vga(A) a Vga(A)_{LC} a jeho hybridných variant bola v minulosti používaná agarová dilúčna metóda (NOVOTNA a JANATA 2006, KROOVA 2011) a to z toho dôvodu, že táto metóda je kvantitatívna a poskytujúca jasnú informáciu o sile rezistencie.

Tak isto v tejto práci bola zo začiatku používaná agarová dilúčna metóda pre testovanie citlivosti kmeňov nesúcich nové mutantné formy Vga(A) k linkomycínu, klinamycínu a pristinamycínu IIA. Namerané hodnoty minimálnych inhibičných koncentrácií však neboli medzi jednotlivými meraniami konzistentné a navyš ani hodnoty minimálnych inhibičných koncentrácií zistené u kontrolných kmeňov neodpovedali skôr publikovaným výsledkom. Tak napríklad mutované proteíny dosahovali minimálnu inhibičnú koncentráciu nižšiu ako *S. aureus* RN4220 nesúci prázdny plazmid pRB374.

Z toho dôvodu sme sa rozhodli otestovať použitie diskovej difúznej metódy. Táto metóda je založená na difúzii antibiotika do agaru a vytvorenia postupne klesajúcich koncentrácií daného antibiotika. Výsledkom je priemer inhibičnej zóny, ktorá inhibuje rast baktérii. Jednou z výhod tejto metódy je, že štandardizované disky napustené antibiotikom sú s výnimkou diskov obsahujúcich pristinamycín IIA komerčne dostupné. Disky s obsahom pristinamycínu IIA (30 µg/disk) boli pripravované v našom laboratóriu rozpustením požadovaného množstva antibiotika v metanole a nanosením na disk, vždy pred začatím testovania. Keďže bol disk s obsahom pristinamycínu IIA pripravovaný manuálne, bol na kultivačnú pôdu určenú na stanovenie citlivosti pridávaný v dvojici, aby sa predišlo skresleniu výsledkov z dôvodu nepresnosti pri pipetovaní.

Pre testovanie diskovej difúznej metódy sme použili kmene nesúce Vga(A), Vga(A)_{LC} a ich hybridy, ktoré boli vytvorené a otestované skôr (Novotná a Janata, 2006). Hodnoty minimálnych inhibičných koncentrácií prevzatých z publikácie boli porovnané s novo nameranými priemerami inhibičných zón. Erytromycín, ku ktorému žiaden z konštruktov neudeľuje rezistenciu, bol používaný ako kontrolné antibiotikum. Ako je znázornené v tabuľke XX, hodnota minimálnych inhibičných koncentrácií korelovala s priemerami inhibičných zón získaných diskovým difúznym testom.

Napríklad: pre Vga(A) proteín exprimovaný v *S. aureus* RN4220 bola minimálna inhibičná koncentrácia na linkomycín 2 µg/ml, čo zodpovedalo priemeru inhibičnej zóny 18 milimetrov. Pre Vga(A)_{LC} proteín exprimovaný v *S. aureus* RN4220 bola minimálna inhibičná koncentrácia na linkomycín 8 µg/ml čo zodpovedalo priemeru inhibičnej zóny 6 milimetrov. Naopak *S. aureus* RN4220, ktorý obsahoval prázdny plazmid pRB374 dosahoval minimálnu inhibičnú koncentráciu pre linkomycín 1 µg/ml čo zodpovedalo priemeru inhibičnej zóny 20 milimetrov.

Tab. XX. – Porovnanie hodnôt minimálnych inhibičných koncentrácií s priemermy inhibičných zón

plazmid alebo proteín exprimovaný v <i>S. aureus</i> RN 4220	LINKOMYCÍN		KLINDAMYCÍN		PRISTINAMYCÍN IIA	
	MIC (µg/ml)	DDT (mm)	MIC (µg/ml)	DDT (mm)	MIC (µg/ml)	DDT (mm)
pRB374	1	20	0,125	26	2	23
Vga(A)	2	14	0,25	24	32	6
Vga(A)_{LC}	8	8	2	16	8	18
Vga(A)blc*	2	13	0,125	21	32	6
Vga(A)xlc*	2	16	0,25	20	32	11
Vga(A)blcxlc*	2	14	0,25	17	32	6
Vga(A)_{LC}ba*	16	6	4	6	16	14
Vga(A)_{LC}xa*	8	6	2	18	8	17
Vga(A)_{LC}baxa*	16	6	4	6	16	15

Pozn.: MIC – minimálna inhibičná koncentrácia, DDT diskový difúzny test, * - hybridné proteíny.

Schématické znázornenie konštruktov je uvedené v tabuľke I.

Pre jednoduchšie vyhodnotenie citlivosti kmeňov nesúcich nové mutantné formy Vga(A) proteínu sme na základe porovnaní hodnôt priemerov inhibičných zón s minimálnymi inhibičnými koncentraciami stanovili rozmedzie hodnôt priemerov inhibičných zón tak aby bolo možné semikvantitatívne roztriediť testované kmene podľa miery citlivosti na vysoko rezistentné, rezistentné a citlivé (Tab. XXI).

Tab. XXI. – Definícia kategórii citlivosti podľa hodnôt minimálnych inhibičných koncentrácií a príslušných priemerov inhibičných zón pre posudzovanie citlivosti *S. aureus* RN4220 exprimujúci mutované formy Vga(A)

stupeň rezistencie	LINKOMYCÍN			KLINDAMYCÍN			PRISTINAMYCÍN IIA		
	MIC ¹	DDT ²	³	MIC ¹	DDT ²	³	MIC ¹	DDT ²	³
vysoko rezistentný	≥8	6 – 10	L	4	6 – 15	C	≥32	6 – 11	PA
rezistentný	2-4	11 – 17	I	0,25-2	16 – 23	c	8-16	12 – 18	pa
citlivý	1 ≤	18 ≤		0,125 ≤	24 ≤		4 ≤	19 ≤	

¹ MIC – Minimálna inhibičná koncentrácia (mg/l)

²DDT – Priemery inhibičných zón (mm)

³Označenie fenotypu

4.1.2.1. Stanovenie citlivosti kmeňov exprimujúcich novo pripravené mutantné formy proteínov Vga(A) a Vga(A)_{LC}

U transformantov bakteriálneho kmeňa *Staphylococcus aureus* RN4220 exprimujúcich mutovaný proteín bola stanovená citlivosť diskovou difúznou metódou.

Stanovenie citlivosti diskovou difúznou metódou prebiehalo v troch nezávislých meraniach, výsledná veľkosť inhibičnej zóny zodpovedala aritmetickému priemeru nameraných hodnôt. Pripravená bakteriálna suspenzia bola identická s kontrolnou suspenziou 1 McFarland. Vyhodnotenie diskovej difúznej metódy bolo prevedené po 24 hodinovej kultivácii pri teplote 37°C. Ako kontroly bol použitý kmeň s prázdnyim vektorom pRB374 a kmene exprimujúce Vga(A)_{LCba}, Vga(A)_{xl}c.

V tabuľke XXII. sú uvedené priemerné hodnoty inhibičných zón stanovené diskovou difúznou metódou z troch nezávislých meraní.

Tab. XXII – Priemerné hodnoty inhibičných zón pripravených konštruktov a kontrolných kmeňov stanovené diskovou difúznou metódou z troch nezávislých meraní.

Kombinácie aminokyselín v pozícii 212, 219, 220, 226 ¹	CLI	LIN	PIIA	Výsledný rezistenčný fenotyp
S V T S Vga(A) _{LC}	9	6	13	CLpa
S G T S	17	6	20	cL
S V T G	18	6	18	cLpa
S G T G	20	6	18	cLpa
S V A S	19	8	20	cL
L G T S	21	9	15	cLpa
L V T S	23	14	21	cl
L G A S	21	15	14	clpa
L G A G Vga(A)	20	16	11	cIPA
S G A G	24	18	19	-
pRB374	24	19	19	-
ATCC 25923	26	19	23	-

Pozn.: ¹Červenou farbou sú označené aminokyseliny charakteristické pre Vga(A)_{LC} proteín.

Zelenou farbou sú označené aminokyseliny charakteristické pre Vga(A) proteín.

Z výsledkov uvedených v tabuľke XXII. vyplýva, že vysokú rezistenciu k obom linkozamidom (fenotyp **CLpa**) udeľuje iba konštrukt exprimujúci proteín Vga(A)_{LCba}.

Kmene exprimujúce mutantné formy proteínov Vga(A) a Vga(A)_{LC} v kombinácii aminokyselín SGTS, SVTG, SGTG, SVAS, LGTS sú tak isto podľa našich kritérií vysoko rezistentné k linkomycínu avšak iba rezistentné ku klindamycínu. Z týchto piatich kmeňov tri boli taktiež rezistentné k pristinamycínu IIA (fenotyp **cLpa**). Zvyšné dva kmene boli k pristinamycínu citlivé (fenotyp **cL**). Rezistenčný fenotyp **clpa** bol charakteristický pre konštrukt s aminokyselinovou kombináciou LGAS. Konštrukt s aminokyselinovou kombináciou SGAG dosahoval priemery inhibičných koncentrácií identické s pRB374, čo nasvedčuje tomu, že proteín je nefunkčný.

4.2. Porovnanie rezistenčného fenotypu nových Vga(A) variant

S rastúcim počtom novo sekvenovaných génómov pribúdajú v databáze sekvencií GenBank tak isto aj nové varianty Vga(A), u ktorých väčšinou nebola zisťovaná schopnosť udeľovať rezistenciu k linkozamidom a streptoramínom. Tieto nové varianty majú okrem rôznych kombinácií aminokyselín špecifických pre Vga(A) a Vga(A)_{LC} proteín v pozíciách 212, 219, 220, 226 aj ďalšie aminokyselinové zámény v rovnakom 15 aminokyselín dlhom variabilnom úseku. Je samozrejme zaujímavé zistiť, ako sa tieto nové aminokyselinové zámény podieľajú na udeľovaní substrátovej špecificity Vga(A) proteínov. Aby bolo možné porovnať vplyv týchto nových variabilných miest na substrátovú špecificitu proteínu Vga(A) boli tieto mutácie opäť zavedené do hybridného proteínu Vga(A)_{LCba}. Cieľom tejto časti diplomovej práce bolo pripraviť varianty Vga(A) proteínu nesúceho vo variabilnom úseku kombinácie aminokyselín odpovedajúce sekvenciám uložených v databáze pod týmito identifikačnými kódmi ACX34100.1 s kombináciou aminokyselín LGKTGAG, CBB44503.1 s kombináciou aminokyselín SGRKGTG a ZP_04826591.1 s kombináciou aminokyselín SSRKGTG (Obr. 15).

Obr. 15 – Porovnanie rozdielov v aminokyselinovej sekvencii všetkých variant Vga(A) proteínov dostupných v databáze GenBank.

Názov proteínu	ID proteínu	Druh	Rezistenčný fenotyp	Aminokyselinová pozícia																									
				4	9	24	26	36	41	113	150	163	176	212	215	216	218	219	220	226	235	247	323	383					
Vga(A)	AF117259_3	<i>S. aureus</i>	SgA	M	N	R	K	I	S	N	D	N	E	L	G	K	K	G	A	G	V	S	P	S					
Vga(A) _{LC}	ABH10964.1	<i>S. haemolyticus</i>	LC SgA	L	H	R	K	I	S	N	D	N	E	S	G	K	K	V	T	S	V	R	P	S					
	FJ207465	<i>S. aureus</i>	LC SgA PI	L	H	R	K	I	S	N	D	N	E	S	G	K	K	G	T	S	V	R	P	S					
	ADA62827.1	<i>S. epidermidis</i>		M	H	R	N	I	S	N	D	N	E	L	G	K	K	G	A	G	V	S	P	S					
	ACX34100.1	<i>S. aureus</i>		M	H	R	N	I	S	N	D	N	E	L	G	K	T	G	A	G	V	S	P	S					
	CBB44503.1	<i>S. aureus</i>		M	H	H	K	V	N	N	E	K	D	S	G	R	K	G	T	G	V	S	P	N					
	ZP_04826591.1	<i>S. epidermidis</i>		M	H	R	K	V	N	D	E	N	E	S	S	R	K	G	T	G	I	S	H	N					
	ZP_04796279.1	<i>S. epidermidis</i>		M	H	R	N	I	S	N	D	N	E	L	G	K	T	G	A	G	V	S	P	S					

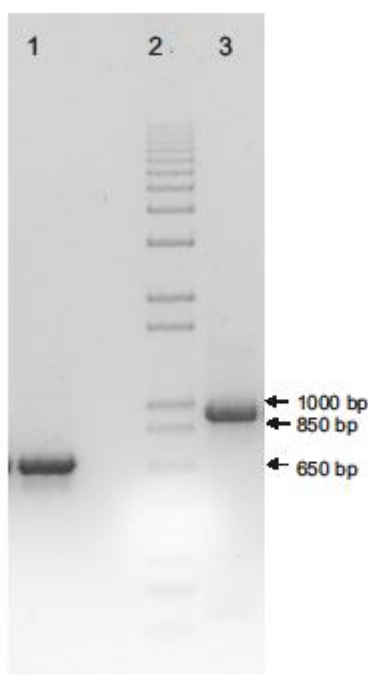
Pozn.: Na obrázku sú znázornené jednotlivé aminokyseliny a ich pozície, ktorými sa jednotlivé proteíny navzájom líšia. V červenom ráme sú znázornené jednotlivé aminokyselinové sekvencie klinických izolátov v oblasti linkeru. Červenou farbou sú označené aminokyseliny charakteristické pre Vga(A)_{LC} proteín. Zelenou farbou sú označené aminokyseliny charakteristické pre Vga(A) proteín.

V tomto prípade sme pre mutagenézu zo začiatku používali komerčnú súpravu In-Fusion® HD Cloning Kit. Pomocou tohto prístupu sa podarilo pripraviť len variantu Vga(A) nesúcu vo variabilnej oblasti kombináciu aminokyselín LGKTGAG. Zvyšné dva varianty boli po niekoľkých neúspešných pokusoch pripravované podľa návodu komerčnej súpravy QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit. Avšak ani týmto prístupom sa nepodarilo tieto mutanty do dnešného dňa pripraviť.

4.2.1. Príprava konštruktu pomocou In-Fusion® HD Cloning Kit

Pomocou In-Fusion® HD Cloning Kitu bola pripravená jedná mutácia v gène exprimujúceho proteín Vga(A)_{LC}ba. Táto mutácia vznikla spojením vektoru pRB374, ktorý bol linearizovaný restričným štiepením pomocou enzýmov HindIII, BamHI a dvoch PCR produktov. Prvý PCR produkt bol syntetizovaný z génu *vga(A)* pomocou primerov Vga-HindIII-F a LTGAG-R. Druhý PCR produkt bol syntetizovaný z génu *vga(A)*_{LC} pomocou primerov LTGAG-F a Vga-BamHI-R.

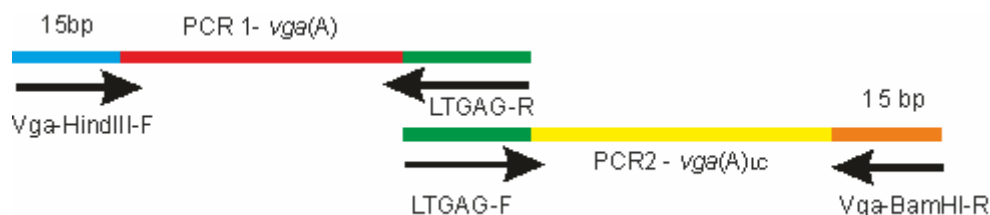
Správnosť PCR reakcií bola overená elektroforetickým delením (Obr. 16) (prvý PCR produkt dosahoval veľkosť 706 bp a druhý PCR produkt dosahoval veľkosť 964 bp). Presný postup prevedenia samotnej reakcie je uvedený v kapitole 3.2.3.1. Na obrázku 17 je schematické znázornenie prípravy PCR produktov.



Obr.16. – Kontrolná elektroforéza po amplifikácii PCR produktov.

1. PCR produkt 1 (amplifikácia časti génu *vga(A)*);
2. štandard;
3. PCR produkt 2 (amplifikácia časti génu *vga(A)*_{LC})

Obr.17. – Schématické znázornenie prípravy PCR produktov



Takto pripravený konštrukt obsahujúci mutáciu bol transformovaný teplotným šokom do Stellar™ kompetentných buniek a kultivovaný pri teplote 37°C 24 hodín na LB agare s prídavkom karbenicilínu (100 µg/ml).

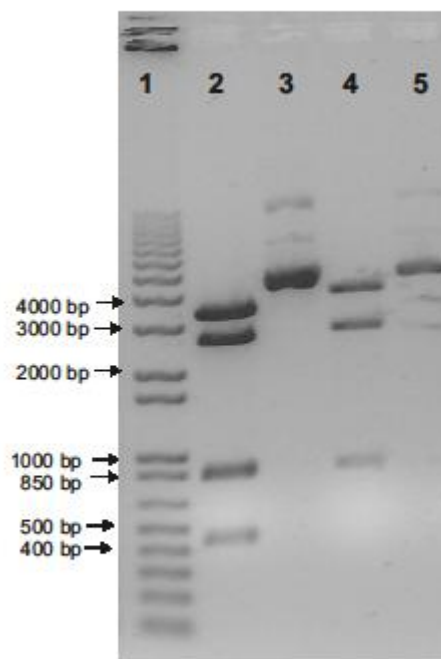
Pomocou Nucleospin® Plasmid kitu (Machinery-nagel) bola z buniek vyizolovaná plazmidová DNA. Úspešnosť metódy In-Fusion bola kontrolovaná restričnou analýzou pomocou enzýmov KpnI a NsiI. Pomocou týchto enzýmov je možné odlišiť nemutovaný konštrukt, ktorý bol použitý do PCR reakcie ako templát a nový konštrukt, ktorý vznikol rekombináciou PCR produktov s linearizovaným vektorom (Obr.18). Rozdiel spočíva v tom, že templát pRB374::vga(A) bol pripravený pomocou tradičného klonovania vyštiepením fragmentu z pJAKO. Takto pripravený konštrukt obsahuje o jedno restričné miesto menej. Veľkosť fragmentov v prípade vytvorenia mutácie je uvedený v tabuľke XXIII.

Tab. XXIII – Restričná analýza pomocou enzýmov NsiI a KpnI

Konštrukt	Očakované fragmenty (bp)
pRB374.Vga(A) _{LCba} . LGKTGAG	3429, 2696, 886, 486
pRB374 s génom, ale bez mutácie	3924, 2746, 886
Prázdny pRB374	3424, 1623, 890, 12

Obr. 18. – Kontrolná restrikcia
pomocou restriktčných enzýmov NsiI
a KpnI

1. štandard;
2. pRB374.Vga(A)_{LCba}. LGKTGAG štiepený
NsiI/KpnI;
3. pRB374.Vga(A)_{LCba}. LGKTGAG
4. pRB374 s génom, ale bez mutácie štiepený
NsiI/KpnI;
5. pRB374 s génom, ale bez mutácie



Pripravený konštrukt pRB374::Vga(A)_{LCba}. LGKTGAG bol po kontrolných analýzach sekvenovaný s pozitívnym výsledkom a následne transformovaný elektroporáciou do kompetentných buniek *Staphylococcus aureus* RN4220. Bunky boli kultivované na NYE agare s prídavkom kanamycínu (80 µg/ml). V ďalších krokoch bolo postupované ako v kapitole 4.1.

Takto pripravený bakteriálny kmeň exprimujúci mutovaný proteín bol použitý na testovanie citlivosti k linkozamidovým a streptogramínovým antibiotikám.

4.2.2. Citlivosť nových Vga(A) variant k streptogramínom a linkozamidom

U transformanta bakteriálneho kmeňa *Staphylococcus aureus* RN4220 exprimujúceho mutovaný proteín Vga(A)_{LCba}.LGKTGAG bola stanovená citlivosť (Tab. XXIV.) diskovou difúznou metódou rovnakým spôsobom ako je popísané v kapitole 4.1.2.1. Štvorica aminokyselín v pozícii 212, 219, 220 a 221 proteínu Vga(A)_{LCba}.LGKTGAG

je identická s proteínom Vga(A). Avšak rozdiel spočíva v pozícii 218 kde je lyzín zamenený za treonín.

Tab. XXIV. – Priemerné hodnoty inhibičných zón pripraveného konštruktu a kontrolných kmeňov stanovené diskovou difúznou metódou z troch nezávislých meraní.

<i>Staphylococcus aureus</i> RN 4220 nesúci konštrukt	CLI	LIN	PIIA	Rezistenčný fenotyp
vga(A)_{LC} ba	9	6	13	CLpa
L G K T G A G	18	6	17	cLpa
pRB374	24	19	19	-
ATCC 25923	26	19	23	-

Predpokladali sme, že výsledok testovania citlivosti konštruktu exprimujúceho mutovaný proteín bude podobný s rezistenčným fenotypom, ktorý udeľuje Vga(A) proteín. Avšak prekvapivo zámena v 218. pozícii spôsobila posun substrátovej špecificity od pristinamycínu IIA smerom k linkozamidom.

Aj napriek tomu, že 212., 219., 220. a 226. pozícia aminokyselín ostala zachovaná (sekvencia aminokyselín identická v Vga(A) proteínom), došlo zámenou v 218. aminokyselinovej pozícii k zmene rezistenčného fenotypu (zníženie rezistencie na streptogramíny, ale zároveň zvýšenie rezistencie na linkozamidy). Práve tento experiment nám rozšíril poznatky o tom, že nielen aminokyseliny v pozícii 212, 219, 220 a 226 sú zodpovedné za substrátovú špecificitu.

4.3. Príprava konštruktu exprimujúci funkčný proteín Vga(A)

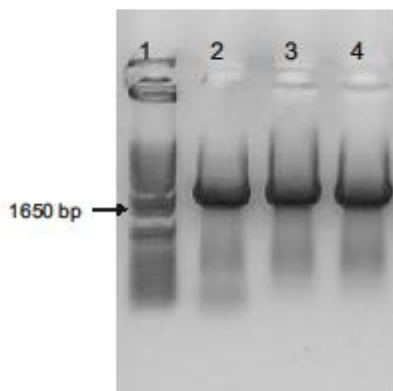
umožňujúci overenie bunkovej lokalizácie pomocou imunodetekcie

Vga(A) proteín patrí do druhej triedy ARE podrodiny ABC proteínov. Táto trieda je charakteristická absenciou transmembránovej domény. Napriek tomu sa všeobecne predpokladá, že Vga(A) a príbuzné proteíny fungujú ako transportéry aktívne odčerpávajúce antibiotikum z bunky. Avšak doposiaľ nebol identifikovaný žiadny membránový proteín, ktorý by spolu s Vga(A) tvoril funkčný transportér. Preto bola navrhnutá aj alternatívna hypotéza, ktorá predpokladá, žeby tieto proteíny mohli interagovať s ribozómami a ovplyvňovať tak väzbu antibiotík do svojho zásahového miesta. Podrobnejšia charakteristika oboch hypotéz je uvedená v kapitole 2.1.6. Napriek tomu, že Vga(A) nemá transmembránovú doménu, bolo ukázané, že interaguje s membránou (CHESNEAU *et al.* 2005). To nasvedčuje tomu, žeby proteín mohol skutočne interagovať s iným transmembránovým proteínom a tvoriť tak funkčný transportér.

Aby sme mohli overiť či Vga(A) proteín interaguje s membránou priamo alebo prostredníctvom interakcie s membránovým proteínom pripravili sme konštrukty exprimujúce Vga(A) proteín fúzovaný s rôznymi peptidovými kotvami, ktorý umožní jeho imunodetekciu v bunkových frakciách. Aby sme si boli istý, že kotva neovplyvňuje funkciu proteínu a tým aj prípadnú bunkovú lokalizáciu, po transformácii konštruktov do *S. aureus* RN4220 sme testovali schopnosť proteínov udeľovať rezistenciu k antibiotikám.

Testovali sme dva typy fúznych kotiev. Histidínová kotva je zložená zo šiestich po sebe nasledujúcich histidínov. FLAG kotva je tvorená oktapeptidom DYKDDDDK. Výhodou použitia kotiev ku značeniu proteínu je, že špecifické protilátky sú bežne komerčne dostupné. Histidínová kotva bola testovaná na C-konci Vga(A) proteínu a FLAG kotva bola testovaná na C- a N-konci Vga(A) proteínu. Histidínovú kotvu na N-konci sa žiaľ ešte nepodarilo pripraviť. Oligonukleotidy kódujúce kotvy boli zainkorporované do génu *vga(A)* behom PCR amplifikácie, tak že *vga(A)* špecifické primery obsahovali sekvencie jednotlivých kotiev.

Prítomnosť PCR produktov bola po amplifikácii overená separáciou na agarózovom géle. Očakávaná veľkosť fragmentov v závislosti na použitej kotve bola v rozmedzí 1619bp. – 1625 bp (Obr.19).



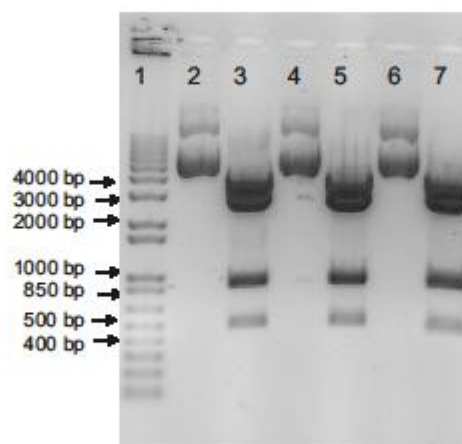
Obr. 19. – Elektroforetická analýza značených proteínov.

1. štandard
2. *vga(A)* gén obsahujúci na 5' konci kotvu FLAG (označený ako VgaA-flag-BamHI)
3. *vga(A)* gén obsahujúci na 3' konci kotvu FLAG (označený ako VgaA-flag-HindIII)
4. *vga(A)* gén obsahujúci na 3' konci histidinovú kotvu (označený ako VgaA-6His)

PCR produkty boli prečistené pomocou Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Pripravené PCR produkty boli štiepené restriktónymi enzýmami HindIII a BamHI. Po restrikcií boli konštrukty vyizolované z gélu a pripravené na ligačnú reakciu s vopred pripraveným linearizovaným vektorom pRB374-BamHI/HindIII. Ligácia prebiehala po dobu 18 hodín pri teplote 4°C. Kontrola správnosti ligácie bola potvrdená restriktónou analýzou pomocou enzýmov KpnI, NsiI. Jednotlivé dĺžky fragmentov sú uvedené v tabuľke XXV. a obrázku 20.

Tab. XXV. – Restriktóna analýza značených proteínov (NsiI, KpnI)

konštrukt	enzýmy	Očakávané fragmenty v bp
pRB374. <i>vga(A)</i> -flag-BamHI	KpnI, NsiI	3421, 2700, 890, 472, 12
pRB374. <i>vga(A)</i> -flag-HindIII	KpnI, NsiI	3421, 2724, 890, 472, 12
pRB374. <i>vga(A)</i> -6His	KpnI, NsiI	3421, 2700, 890, 490, 12



Obr. 20. – Elektroforetická analýza po restrikcií

1. štandard veľkosti DNA; 2. pRB374.vga(A)-6His; 3. pRB374.vga(A)-6His štípený KpnI/NsiI;
 4. pRB374.vga(A)-flag-BamHI; 5. pRB374.vga(A)-flag-BamHI štípený KpnI/NsiI;
 6. pRB374.vga(A)-flag-HindIII; 7. pRB374.vga(A)-flag-BamHI štípený KpnI/NsiI
- * fragment o veľkosti 12 bp nie je na obrázku viditeľný, z dôvodu jeho malej veľkosti.

Po overení sekvencie (pomocou primerov pRB374 F, pRB374 R, VgaK2F) boli konštrukty transformované elektroporáciou do citlivého kmeňa *Staphylococcus aureus* RN4220 a kultivované na NYE agare s prídavkom kanamycínu (80 µg/ml), 24 hodín pri teplote 37°C.

Prítomnosť transformovaného plazmidu v *S. aureus* RN4220 bola overená pomocou PCR tak ako je popísané v kapitole 4.1.1. a znázornené na obrázku 14a a 14b.

U všetkých značených proteínov bola stanovená citlivosť pomocou diskovej difúznej metódy. Ako kontrolné kmene boli používané kmene *Staphylococcus aureus* RN4220 ktoré boli transformované prázdny vektorom pRB374 a pRB374::vga(A)

Tab. XXVI. – Priemerné hodnoty inhibičných zón značených proteínov a kontrolných kmeňov stanovené diskovou difúznou metódou z troch nezávislých meraní.

<i>Staphylococcus aureus</i> RN 4220 nesúci konštrukt	CLI	LIN	PIIA
pRB374	24	19	19
vgaA	24	14	8
vgaA-flag-BamHI	25	18	19
vgaA-flag-HindIII	23	18	21
vgaA-6His	24	19	19
ATCC 25923	26	19	23

Z výsledkov uvedených v tabuľke XXVI. vyplýva, že inhibičné zóny všetkých značených proteínov sú takmer identické s inhibičnými zónami bakteriálneho kmeňa obsahujúceho prázdny vektor pRB374. Ani jeden značený proteín nedosahoval aspoň približné hodnoty minimálnych inhibičných zón charakteristických pre bakteriálny kmeň exprimujúci divoký proteín Vga(A). Z toho výsledku je možné usudzovať, že oba typy kotiev negatívne ovplyvňujú funkciu Vga(A) proteínu nezávisle na tom či sú lokalizované na N-konci alebo na C-konci.

5. Diskusia

Rezistencia predstavuje závažný celosvetový problém. Je to dôležitá téma, o ktorú sa v dnešnej dobe odborníci veľmi často zaujímajú. V druhej polovici 20. storočia, kedy sa začalo využívanie antiinfekčných liečiv v medicíne, dramaticky poklesli ochorenia a úmrtia, ktoré spôsobovali baktérie. V prvých rokoch po zavedení antimikróbných liečiv do klinickej praxe si začali baktérie vyvíjať rôzne mechanizmy, ktoré im umožňujú prežívať aj v prítomnosti antibiotík. Dôvodom šírenia rezistencie je nadmerné a neuvážené používanie antibiotík. Aby sa predišlo vzniku a šíreniu rezistencie, je potrebné zahájiť liečbu včas, použiť čo najefektívnejšie antibiotikum pre daného pôvodcu a dôkladne vyliečiť ochorenie. Pochopenie mechanizmu rezistencie na danú antimikróbnu látku je dôležitý proces, ktorého výsledkom môže byť úprava liečiva, respektíve výroba účinnejšej látky.

Predložená diplomová práca vychádza z poznatkov práce Novotna a Janata (2006) o rezistenčných proteínoch Vga(A) a Vga(A)_{LC}, ktoré sa líšia svojou schopnosťou udeľovať rezistenciu k linkozamidom. Ako bolo ukázané, za tento rozdiel v substrátovej špecificite je zodpovedná štvorica aminokyselín v pozícii 212, 219, 220 a 226. Kombinácia aminokyselín LGAG z Vga(A) zvyšuje rezistenciu k streptogramínom A, zatiaľ čo prítomnosť kombinácie SVTS z Vga(A)_{LC} zvyšuje rezistenciu k linkozamidom. U nových variant Vga(A) proteínov, ktoré sú dostupné v databáze sa aminokyselinové zbytky v týchto štyroch pozíciách vyskytujú v rôznych kombináciách. To vyvoláva otázku aký je vplyv jednotlivých aminokyselín v pozíciách 212, 219, 220 a 226 na substrátovú špecificitu proteínu Vga(A). V rámci tejto diplomovej práce boli vytvorené varianty proteínu Vga(A), ktoré obsahovali vzájomné kombinácie aminokyselín špecifické pre Vga(A) a Vga(A)_{LC} proteín. Ako pozadie pre vkladanie mutácii bol použitý hybridný proteín Vga(A)_{LC}ba, ktorý má substrátovú špecificitu zhodnú s Vga(A)_{LC} proteínom, avšak je ešte dva krát viac tak účinnejší ako samotný Vga(A)_{LC} proteín. Zo 14 možných kombinácií sa nám podarilo pripraviť 8 (LGTS, LVTS, LGAS, SVTG, SGAG, SVAS, SGTG, SGTS), čo vrátane originálnej kombinácie SVTS špecifickej pre Vga(A)_{LC} proteín a LGAG špecifickej pre Vga(A) proteín činí 10 kombinácií. U týchto kombinácií bola testovaná citlivosť k linkomycínu, klindamycínu a pristinamycínu IIA diskovým difúznym testom. Testované kmene exprimujúce mutované proteíny boli na základe veľkosti inhibičných zón rozdelené na

vysoko rezistentné, rezistentné a citlivé. Toto triedenie nemá nič spoločné s posudzovaním citlivosti izolátov v klinickej praxi a v tomto štúdiu slúži pre ľahšie vyhodnocovanie rozdielov v rezistenčnom fenotype medzi jednotlivými proteínmi.

Mutované proteíny, ktoré obsahujú vo svojej sekvencii kombinácie aminokyselín SGTG, SVTG, a LGTS udeľujú rovnaký rezistenčný fenotyp, **cLpa**. Čo znamená, že oproti $Vga(A)_{LC}$ s kombináciou SVTS došlo k zníženiu rezistencie ku klindamycínu.

Rezistenčný fenotyp **cL** bol zistený u kmeňov exprimujúcich mutované proteíny, u ktorých kombinácia aminokyselín bola SGTS a SVAS. Tieto dve kombinácie tak mali za následok v porovnaní s $Vga(A)_{LC}$ proteínom zníženie rezistencie ku klindamycínu a k pristinamycínu IIA.

cl fenotyp, čiže stredná rezistencia iba k linkozamidom, bol popísaný iba u jedného kmeňa exprimujúceho proteín, ktorého sekvencia obsahovala kombináciu aminokyselín LVTS. Charakteristikou tohto fenotypu je nízka rezistencia na klindamycín aj linkomycín a citlivosť na streptogramíny A. Preferencia k linkozamidom však rovnako ako u predchádzajúcich kombinácii ostala zachovaná, len s tým rozdielom, že proteín s touto kombináciou je pravdepodobne menej účinný. $Vga(A)$ mutanta obsahujúca kombináciu aminokyselín LGAS vykazovala **clpa fenotyp**. Čo znamená nízku rezistenciu ku všetkým testovaným antibiotikám. Je zaujímavé, že proteín s touto kombináciou aminokyselín, ktorá je až na serín v pozícii 228 identická s $Vga(A)$ neuprednostňuje ani jednu skupinu antibiotík.

U kmeňa s proteínom obsahujúcim kombináciu SGAG došlo k výraznému zvýšeniu citlivosti na všetky testované antibiotiká. Priemery inhibičných zón boli identické s priemerami inhibičných zón nameraných pri testovaní kmeňa s prázdnyim vektorom pRB374. Proteín s touto kombináciou aminokyselín je pravdepodobne nefunkčný. Dôvodom môže byť strata schopnosti rozpoznávať linkozamidy a pristinamycín, alebo to môže byť spôsobené jeho nesprávnym zložením. Ďalším z dôvodov môže byť taktiež znemožnenie interakcie s membránou. Táto možnosť môže byť jednoducho overená pomocou imunodetekcie proteínu v bunkových frakciách.

Tým že nie sú pripravené konštrukty so všetkými kombináciami aminokyselín, nie je možné komplexne vyhodnotiť konkrétny vplyv jednotlivých aminokyselín na substrátovú špecificitu. Avšak z toho čiastočného súboru, ktorý obsahuje mutované proteíny s desiatimi rôznymi kombináciami aminokyselín vyplýva niekoľko zaujímavých skutočností. Variabilitou aminokyselín je oveľa ľahšie dosiahnuť vysokú

rezistenciu k linkozamidom než ku streptogramínom A. Vysokú rezistenciu k pristinamycínu IIA je schopný udeľovať iba Vga(A) proteín s pôvodnou kombináciou aminokyselín LGAG. Ako najúčinnější variantu udeľujúca vysoké hladiny rezistencie k oboj linkozamidom sa ukázala opäť iba originálna kombinácia aminokyselín SVTS, špecifická pre Vga(A)_{LC} proteín.

Chýbajúce kombinácie aminokyselín sú v štádiu prípravy a budeme sa nimi zaoberať v ďalšom úseku štúdia.

Rovnaká kombinácia aminokyselín, SGTS, ako sme testovali vo vyššie zmienenom súbore sa vyskytuje taktiež vo variante Vga(A) proteínu, ktorý bol bližšie charakterizovaný v štúdiu Gentry *et al.* (2008). V tejto štúdiu bol rezistenčný fenotyp udeľovaný Vga(A) proteínom (identifikačné číslo proteínu FJ207465) zistený po prenose plazmidu nesúceho príslušný gén do citlivého *S. aureus* RN4220. Nameraná minimálna inhibičná koncentrácia bola u tohto kmeňa 32 µg/ml pre linkomycín a 4 µg/ml pre klindamycín. Nami nameraná veľkosť inhibičnej zóny u kmeňa exprimujúceho proteín s rovnakou kombináciou aminokyselín bola 17 mm pre klindamycín a 6 mm pre linkomycín to by mohlo odpovedať minimálnej inhibičnej koncentrácii pre klindamycín približne 0,25 µg/ml a 8 µg/ml pre linkomycín. Oba proteíny majú rovnakú preferenciu k linkozamidom, avšak líšia sa vo svojej schopnosti udeľovať rezistenciu. Za tento rozdiel môže byť zodpovedná sila promotóru, z ktorého sú oba gény prepisované. Plazmid, ktorý bol prenesený do kmeňa *S. aureus* RN4220 vo vyššie zmienenej štúdiu bol totiž izolovaný priamo z klinického izolátu a *vga(A)* gén je v podstate prepisovaný z vlastného promotóru Ten je pravdepodobne omnoho silnejší než vegetatívny promotór *vegII*, ktorý je súčasťou klonovacieho vektoru pRB374.

Naviac bolo zistené, že tento kmeň udeľoval pomerne vysokú rezistenciu na retapamulín (MIC až 32 µg/ml) (medzi pleuromutilíny patrí aj retapamulín využívajúci sa v klinickej praxi, ktorý inhibuje proteosyntézu väzbou do 50S podjednotky bakteriálneho ribozómu). To môže nasvedčovať tomu, že ostatné Vga(A) proteíny udeľujú rezistenciu aj na túto skupinu antibiotík. Bude zaujímavé otestovať všetky pripravené konštrukty aj na pleuromutilíny a zistiť ako sa jednotlivé mutanty líšia v schopnosti udeľovať rezistenciu k tomuto antibiotiku.

Okrem skúmania fenotypu udeľovaným mutovanými proteínmi vytvorenými kombináciami Vga(A) a Vga(A)_{LC}, sme sa tak isto zaujímali o rezistenčný fenotyp udeľovaný novými variantami proteínu Vga(A), ktorých sekvencie sú dostupné

v GenBank databáze. Opäť nás zaujímali najmä aminokyselinové zámery v tej istej oblasti linkeru, ktoré ako bolo potvrdené sú dôležité pre určenie substrátovej špecificity proteínu. Izolát meticilín citlivého bakteriálneho kmeňa *Staphylococcus aureus*, ktorý nesie Vga(A) variantu, ktorej sekvencia je udávaná v databáze pod identifikačným číslom ACX34100.1 bol izolovaný v roku 2007 a 2009 (Qin *et al.* 2011). Tento proteín obsahoval podobnú sekvenciu ako je sekvencia proteínu Vga(A). Navyše obsahoval v 26. pozícii zámernu lyzínu za asparagín a v 218. pozícii zámernu lyzínu za treonín. Práve zámerna v 218. pozícii bola inšpiráciou na vytvorenie Vga(A) varianty, ktorá sa od Vga(A) líši len jednou aminokyselinovou zámernou v pozícii 218 (K218T). Rezistenčný fenotyp kmeňa exprimujúceho tento proteín bol **cLpa**. Čo znamená, že proteín je schopný udeľovať rezistenciu k oboj linkozamidom. To znamená, že aminokyselinová substitúcia lyzínu za treonín v pozícii 218 bola zodpovedná za zmenu substrátovej špecificity proteínu Vga(A) s preferenciou streptogramínov na Vga(A)_{LC} s preferenciou linkozamidov.

Qin *et al.* (2011) transformoval plazmid obsahujúci vyššie spomínaný proteín (identifikačné číslo: ACX34100.1) do citlivého kmeňa *Staphylococcus aureus* RN4220. Nameraná hodnota minimálnej inhibičnej koncentrácie klindamycínu bola 8 µg/ml, linkomycín nebol testovaný. Nami nameraný priemer inhibičnej zóny pre klindamycín bol 18 mm. Podľa porovnania minimálnych inhibičných koncentrácií s diskovým difúznym testom priemer inhibičnej zóny 18 mm zodpovedá minimálnej inhibičnej koncentrácií približne 2 µg/ml. Za takto vysoký rozdiel v citlivosti na klindamicín môže byť zodpovedná aj aminokyselina v 26. pozícii, keďže u nášho pripraveného mutovaného proteínu ostala zachovaná v tejto pozícii pôvodná aminokyselina charakteristická pre Vga(A) proteín. Na rozdiel od proteínu uvedeného v publikácii, ktorý obsahoval v 26. pozícii zámernu lyzínu za asparagín. Podľa tohto výsledku môže byť aminokyselina v 26. pozícii zodpovedná za zvýšenie rezistencie na klindamycín.

Avšak rovnako ako bolo popísane vyššie môže byť táto zmena spôsobená aj promótorom, z ktorého je príslušný gén prepisovaný. Tomu nasvedčuje aj fakt, že všetky klinické izoláty *S. haemolyticus* obsahujúce iba Vga(A)_{LC} udeľovali rovnakú rezistenciu ku klindamycínu (MIC 8 µg/ml) ako táto varianta proteínu (Novotná a Janata, 2006).

Okrem vyššie spomínaného izolátu sme sa pokúsili pripraviť aj ďalšie dva konštrukty exprimujúce mutovaný proteín nesúce nové kombinácie aminokyselín vo vnútri variabilnej časti linkeru, ktoré odpovedajú Vga(A) variantam dostupným

v GenBank databáze. Avšak do dnešného dňa sa nepodarilo vytvorenie týchto mutácií. Pravdepodobný dôvod v neschopnosti pripraviť proteín s kombináciami SGRKGTG je v zlom nasyntetizovaní mutačných primerov. Usudzujeme tak z faktu, že sme opakovane pripravili mutovaný proteín, ktorý však okrem požadovaných mutácií obsahoval stále tu istú nežiaduci mutáciu. Dôvod neschopnosti pripraviť druhú variantu s kombináciami aminokyselín SSRKGTG je neznáma.

Základnou charakteristikou proteínov patriacich do ARE podrodiny je absencia transmembránovej domény. Napriek tomu sa predpokladá, že tieto proteíny sú zodpovedné za aktívny eflux antibiotika z bakteriálnej bunky. Z publikácie (Chesneau *et al.* 2005) vyplýva, že Vga(A) proteín je lokalizovaný na membráne. Tento dôkaz významne podporuje hypotézu o transporte. Lokalizácia Vga(A) na membráne bola prevedená imunodetekciou Vga(A)-MalE (maltózu viažuci proteín) fúzného proteínu pomocou MalE špecifickej protilátky. Avšak v tejto práci nebolo overené či si Vga(A)-MalE fúzny proteín zachováva schopnosť udeľovať rezistenciu a či tak membránová lokalizácia nie je produktom akéhosi artefaktu.

Súčasťou tejto diplomovej práce bola príprava fúzných Vga(A) proteínov, ktoré by obsahovali peptidové kotvy umožňujúce imunodetekciu Vga(A) v bunkových frakciách. Pripravili sme tri fúzne proteíny s N-koncovou FLAG kotvou, C-koncovou FLAG a C-koncovou HIS kotvou. Funkčnosť proteínov bola overená porovnaním citlivosti kmeňov exprimujúcich tieto proteíny. Ako z výsledkov vyplýva pripravením takto značených proteínov došlo k ich pravdepodobnej nefunkčnosti, keďže priemery inhibičných zón u kmeňov exprimujúcich fúzované proteíny sú identické s priemermi inhibičných zón kmeňa s prázdnyim vektorom pRB374. Preto tieto fúzne proteíny nemôžeme s istotou použiť pre overenie membránovej lokalizácie a preto bude dôležité pokúsiť sa získať protilátky špecifické pre Vga(A) proteín, pretože dôvodom nefunkčnosti môže byť taktiež znemožnenie ich interakcie s membránou. V budúcnosti budeme lokalizáciu aj týchto nefunkčných proteínov v bunke testovať. To nám umožní zistiť či má kotva vplyv na interakciu s membránou.

Okrem overenia membránovej lokalizácie Vga(A) proteínov nám možnosť imunodetekcie novo pripravených mutant umožní identifikovať, ktorá časť proteínu je zodpovedná za väzbu na membráne, poprípade za interakciu s možným membránovým partnerom.

Meranie minimálnych inhibičných koncentrácií agarovou dilúčnou metódou sa ukázalo ako nepoužiteľné z dôvodu nejednotnosti výsledkov. To mohlo byť spôsobené použitím zásobných antibiotík z ktorých boli pripravované príslušné riedenia. Pristinamycín IIA nie je komerčne dostupný a preto nie je jednoduché získanie čerstvého antibiotika. Používaný prášok pristinamycínu IIA bol dlhodobo skladovaný v laboratóriu, čo mohlo viesť k zníženiu jeho účinnosti. Ďalšou možnosťou je nízka rozpustnosť pristinamycínu IIA vo vode (50 mg/l). Zvýšenie rozpustnosti sa dosahovalo rozpúšťaním antibiotika v metanole a jeho následnému riedeniu vo vode, čo mohlo byť opäť zdrojom nejednotnosti nameraných hodnôt. Taktiež aj u linkomycínu mohla byť aktivita znížená v dôsledku dlhodobého skladovania zásobného prášku. Klindamycín používaný pre testovanie citlivosti v tejto práci bol zakúpený ako nové antibiotikum. Rozdiel oproti klindamycínu používaného v minulosti je v jeho chemickom zložení, keďže pôvodné antibiotikum bolo vo forme bezhydrátu a nové zakúpené antibiotikum bolo vo forme monohydrátu (monohydrát bol zvolený z dôvodu jeho ceny, 100mg bezhydrátu stál takmer 15 000 Kč, 1 g monohydrátu stál 2000 Kč). Aj napriek tomu, že množstvo monohydrátu bolo prepočítané pomocou molekulovej hmotnosti na bezhydrát, nedokázali sme dosiahnuť relevantných výsledkov.

Porovnaním hodnôt minimálnych inhibičných koncentrácií z článku Novotna a Janata (2006) s diskovým difúznym testom použitým pre testovanie citlivosti v tejto diplomovej práci sa overil relevantný vzťah medzi hodnotou minimálnej inhibičnej koncentrácie a veľkosťou inhibičnej zóny. Preto bolo možné diskový difúzny test použiť pre relatívnu kvantifikáciu úrovne rezistencie.

Na začiatku experimentu sme konštrukty pripravovali pomocou komerčne dodávaného setu In-Fusion® HD Cloning Kit. Aj keď všetky reakcie boli robené podľa návodu výrobcu, tak pomocou tohto systému podarilo vytvoriť 1 mutáciu (s dobou trvania takmer 1 rok), kedy boli podmienky tejto reakcie rôzne upravované a vyskúšané mnohé varianty postupu. Ak by tento systém fungoval bol by to dobrý kompromis medzi cenou vytvorenej mutácie a ušetreným časom experimentátora.

Táto diplomová práca je súčasťou projektu, ktorý sa zaoberá pochopením mechanizmu rezistencie, ktorý spôsobujú ARE podrodina proteínov. Objasnenie mechanizmu rezistencie nám môže umožniť prípravu účinných preparátov v boji s bakteriálnymi kmeňmi exprimujúcimi tieto proteíny.

V rámci doktorského štúdia sa budem v tomto laboratóriu ďalej zaoberať posúdením vplyvu sekvenčnej variability Vga(A) a Vga(A)_{LC} proteínu na schopnosť udeľovať rezistenciu. Taktiež sa budeme snažiť posúdiť obe hypotézy mechanizmu rezistencie. Charakterizovať substrátovú špecificitu proteínu Msr(A) a posúdiť riziko selekcie nových variant s rozšíreným spektrom rezistencie.

6. Súhrn

1. V rámci tejto diplomovej práce boli vytvorené varianty proteínu Vga(A), ktoré obsahovali vzájomné kombinácie aminokyselín špecifické pre Vga(A) a Vga(A)_{LC} proteínu v pozícii 212, 219, 220, 226.
2. Zo 14 možných kombinácií sa nám podarilo pripraviť 8 (LGTS, LVTS, LGAS, SVTG, SGAG, SVAS, SGTG, SGTS), čo vrátane originálnej kombinácie SVTS špecifickej pre Vga(A)_{LC} proteín a LGAG špecifickej pre Vga(A) proteín činí 10 kombinácií. U týchto kombinácií bola testovaná citlivosť k linkomycínu, klindamycínu a pristinamycínu IIA diskovým difúznym testom.
3. Mutované proteíny, ktoré obsahujú vo svojej sekvencii kombinácie aminokyselín SGTG, SVTG, a LGTS udeľujú rovnaký rezistenčný fenotyp, **cLpa**, SGTS a SVAS udeľovali rezistenčný fenotyp **cL**, LVTS udeľoval fenotyp **cl**, LGAS udeľoval rezistenčný fenotyp **clpa**, kombinácia aminokyselín SGAG spôsobila, že bakteriálny kmeň exprimujúci mutovaný proteín bol citlivý. Všetky pripravené konštrukty vykazovali rezistenčnú preferenciu k linkozamidom, avšak najlepšie fungovala pôvodná varianta Vga(A)_{LCba}.
4. Pomocou metódy In-Fusion bol pripravený konštrukt Vga(A)_{LCba} so zámenou v pozícii 218. Aminokyselinová substitúcia lyzínu za treonín v pozícii 218 bola zodpovedná za zmenu substrátovej špecificity proteínu Vga(A) s preferenciou streptogramínov na Vga(A)_{LC} s preferenciou linkozamidov.
5. Súčasťou diplomovej práce bola príprava fúzných Vga(A) proteínov, ktoré by obsahovali peptidové kotvy umožňujúce imunodetekciu Vga(A) v bunkových frakciách. Z výsledkov vyplýva, že pripravením takto značených proteínov došlo k ich pravdepodobnej nefunkčnosti, keďže priemery inhibičných zón u kmeňov exprimujúcich fúzované sú identické s priemermi inhibičných zón kmeňa s prázdnyim vektorom pRB374.

6. V súčasnej dobe pokračuje príprava konštruktov exprimujúcich Vga(A) proteín s chybajúcimi kombináciami aminokyselín. Ďalej sa pokračuje vo vytvorení konštruktov exprimujúcich mutované proteíny (SGRKGTG a SSRKGTG) zo sekvencií klinických izolátov dostupných v databáze pomocou metódy QuikChange™. V ďalšom úseku štúdia sa budeme snažiť lokalizovať značené varianty Vga(A) proteínu v bakteriálnej bunke.

7. Literatúra

Alberts, B., Bray D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2008):
Základy buněčné biologie. Preložil Arnošt Kotyk, Bohumil Bouzek, Pavel Hozák.
Espero Publishing, Ústí nad Labem, 212-240.

Allignet, J., Loncle, V., Mazodier, P. and el Solh, N. (1988): Nucleotide sequence of a
staphylococcal plasmid gene, *vgb*, encoding a hydrolase inactivating the B components
of virginiamycin-like antibiotics. Plasmid. 20: 271 – 275.

Andersen, C. B., T. Becker, M. Blau, M. Anand, M. Halic, B. Balar, T. Mielke, T.
Boesen, J. S. Pedersen, C. M. Spahn, T. G. Kinzy, G. R. Andersen, and R. Beckmann.
(2006): Structure of eEF3 and the mechanism of transfer RNA release from the E-site.
Nature 443:663–668.

Authur, M., Autissier, D., Courvalin, P. (1986): Analysis of the nucleotide sequence of
the *ereB* gene encoding the erythromycin esterase type II. Nucleic Acids Res. 14: 4987-
4999.

Berger-Bächi, B. (1997): Resistance Not Mediated By β -Lactamase (Methicillin
Resistance) In: Crocley B.K; et al. The Staphylococci in Human Disease; W.B.
Saunders Company 1.st. edition: 158-167.

Dam, M., Douthwait, S., Tenson, T., Mankin, A.S. (1996): Mutation in domain II of
23S rRNA facilitates translation of 23S rRNA-encoded pentapeptide conferring
erythromycin resistance. J Mol Biol. 259:1-6.

Davidson, A.L., Dassa, E., Orelle, C., Chen, J. (2008): Structure, function, and
evolution of bacterial ATPbinding cassette systems, Microbiol. Mol. Biol.Rev. 72:317-
364.

Duh, R. W., K. V. Singh, K. Malathum, and B. E. Murray. (2001): In vitro activity of 19
antimicrobial agents against enterococci from healthy subjects and hospitalized patients

and use of an ace gene probe from *Enterococcus faecalis* for species identification. *Microb. Drug Resist.* 7:39–46.

Fiebelkorn, K. R., Crawford, S. A. , McElmeel, M. L., Jorgensen, J.H. (2003): Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 41:4740-4.

Gentry, D.R; *et al.* (2008): Genetic characterization of Vga ABC proteins conferring reduced susceptibility to pleuromutilins in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 52(12):4507-9.

Harms, J. M., Schlunzen, F., Fucini, P., Bartels, H. and Yonath, A. (2004): Alterations at the peptidyl transferase centre of the ribosome induced by the synergistic action of the streptogramins dalbavancin and quinupristin. *BMC Biol.* 2: 4.

Haroche, J., Allignet, J., Buchrieser, C., Solh, E. N. (2000): Characterization of Variant of *vga(A)* Confering Resistance to Streptogramin A and Related Compounds. *Antimicrob. Agent and Chemotherapy* 44(9):2271-5.

Bednář, M. *et al.* (1996): *Lekárska mikrobiologie*. Marvil, Praha, 193-202.

Chakraborty, K. (2001): Translational regulation by ABC systems. *Res. Microbiol.* 152:391–399.

Chen, Z. Q., J. S. Dong, A. Ishimura, I. Daar, A. G. Hinnebusch, and M. Dean. (2006): The essential vertebrate ABCE1 protein interacts with eukaryotic initiation factors. *J. Biol. Chem.* 281:7452–7457.

Chesneau, O., Ligeret, H., Hosan-Aghaie, N., Morvan, A. and Dassa, E. (2005): Molecular analysis of resistance to streptogramin A compounds conferred by the Vga proteins of staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 973 – 980.

Jánosi, L., Bán, É. (1982): Localization of genes coding for macrolide resistance on the penicillinase plasmid of isolates of an epidemic *Staphylococcus aureus*. *Acta Microbiol Acad Sci Hung.* 29:187-200.

Jenkins, S. (2006): Trends Associated with Glykopeptides: Heteroresistance, Tolerance, and Lack of Detection. *Clinical updates in infectious diseases.* 8(2): 1-3.

Jenssen, WD., Thakker-Varia, S., Dubin, D.T., Weinstein, M.P. (1987): Prevalence of macrolides-lincosamides-Streptogramin B resistance and *erm* gene classes among clinical strains of staphylococci and streptococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 31:883-8.

Johnston, N. J., Mukhtar, T. A. and Wright, G. D. (2002): Streptogramin antibiotics: Mode of action and resistance. *Current Drug Targets.* 3: 335 – 344.

Julák J., et al. (2010): *Lekárská mikrobiologie pro zubní lékařství.* Karolinum, Praha, 177-187.

Kehrenberg, C., S. Schwarz, L. Jacobsen, L. H. Hansen, and B. Vester. (2005): A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: methylation of 23S ribosomal RNA at A2503. *Mol Microbiol* 57:1064-73.

Kispal, G., K. Sipos, H. Lange, Z. Fekete, T. Bedekovics, T. Janaky, J. Bassler, D. J. A. Netz, J. Balk, C. Rotte, and R. Lill. (2005): Biogenesis of cytosolic ribosomes requires the essential iron-sulphur protein Rli1p and mitochondria. *EMBO J.* 24:589–598.

Koberska, M. et al. (2008): Sequence analysis and heterologous expression of the lincomycin biosynthetic cluster of the type strain *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466. *Folia Microbiol (Praha),* 53(5):395-401.

Kolář, M; et al. (2006): Současné možnosti léčby infekcí způsobených rezistentními grampozitivními bakteriemi. *Klin Farmakol Farm.* 20: 71 – 74.

- Kos, V., Ford, C. R. (2009): The ATP-binding cassette family: a structural perspective. *Cell. Mol. Life Sci.* 66:3111–3126.
- Kroová, M. (2011): Molekulární analýza rezistenčního genu *vga(A)_{LC}*-identifikace klíčových zbytků: Diplomová práce, Praha: UK PřF:59-83.
- Kuroda, M; et al. (2001): Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* 357: 1225 – 1240.
- Kuželová, M., Kovacsová, B., Švec, P. (2010): Farmakológia antiinfekčných liečiv. *Osveta, Martin*, 61 – 103.
- Leclercq, R. (2002): Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis* 34:482-492.
- Licht, A., Schneider, E. (2011): ATP binding cassette systems: structures, mechanisms, and functions, *Cent. Eur. J. Biol.*, 6(5):785-801.
- Lincová, D., Farghali, H., et al. (2007): Základní a aplikovaná farmakologie, Praha, Galén, 468-495.
- Linton, K. J., and C. F. Higgins. (1998): The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol. Microbiol.* 28:5–13.
- Lomovskaya, N., S. K. Hong, S. U. Kim, L. Fonstein, K. Furuya, and R. C. Hutchinson. (1996): The *Streptomyces peucetius drrC* gene encodes a UvrAlike protein involved in daunorubicin resistance and production. *J. Bacteriol.* 178:3238–3245.
- Long, K. S., Poehlsgaard, J., Kehrenberg, C., Schwarz, S. and Vester, B. (2006): The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to Phenicol, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 50: 2500 – 2505.

Marylin, C. R., Sutcliffe J., Courvalin L. B. J., et al. (1999): Nomenclature for Macrolide and Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B Resistance Determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 43: 2823-2830.

Mason *et al.*, (1962): Citovane podľa Barber, M., Waterworth, P. M. 1964. Antibacterial activity of lincomycin and pristinamycin: A comparison with erythromycin. *Brit med J*. 2: 603– 606.

McCafferty, D.G., Cudic, P., Yu, M.K., Behenna, D.C., Kruger, R. (1999): Synergy and duality in peptide antibiotic mechanisms. *Curr Opin Chem Biol* 3:672-680.

Meier, A., Kirschner, P., Springer, B., et al. (1997): Identification of mutations in 23S rRNA gene of clarithromycin-resistant *Mycobacterium intracellulare*. *Antimicrob Agents Chemother*. 38:381-384.

Mendez, C., Salas, J.A. (2001): The role of ABC transporters in antibiotic-producing organisms: drug secretion and resistance mechanisms. *Res. Microbiol*. 152:341–350.

Morar, M., Bhullar, K., Hughes, W.D., Junop, M., Wright, D.G. (2009): Structure and Mechanism of the Lincosamide Antibiotic Adenylyltransferase LinB. *Structure*. Volume 17, Issue 12:1649–1659.

Murat, D., P. Bance, I. Callebaut, and E. Dassa. (2006): ATP hydrolysis is essential for the function of the Uup ATP-binding cassette ATPase in precise excision of transposons. *J. Biol. Chem*. 281:6850–6859.

Murray, P., et al. (2005): *Medical Microbiology*. MOSBY, Philadelphia, Pennsylvania, 963-966.

Nakajima, Y.(1999): Mechanisms of bacterial resistance to macrolide antibiotics. *J Infect Chemother* 5:61-74.

Narita, S., K. Kanamaru, S. Matsuyama, and H. Tokuda. (2003): A mutation in the membrane subunit of an ABC transporter LolCDE complex causing outer membrane

localization of lipoproteins against their inner membranespecific signals. Mol. Microbiol. 49:167–177.

Novick, R. P. (2003): Mobile genetic elements and bacterial toxins: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. Plasmid. 49: 93 – 105.

Novotná, G., Adamková, V., Janata, J., Melter, O. and Spizek, J. (2005): Prevalence of resistance mechanisms against macrolides and lincosamides in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in the Czech Republic and occurrence of an undefined mechanism of resistance to lincosamides. Antimicrob Agents Chemother. 49: 3586 – 3589.

Novotná, G., Janata, J., (2006): A new evolutionary variant of the streptogramin A resistance protein, Vga(A)_{LC}, from *Staphylococcus haemolyticus* with shifted substrate specificity towards lincosamides. Antimicrob Agents Chemother. 50: 4070 - 4076.

Ogston, A. (1880): Ueber Abscesse. Arch Klin Chir. 25: 588-600.

Ogston, A. (1881): Report upon micro-organisms in surgical diseases. Brit Med J. 1: 369-375.

Ounissi, H., Courvalin P. (1985): Nucleotide sequence of the gene *ereA* encoding the erythromycin esterase in *Escherichia coli*. Gene.35:271-278.

O'hara, K., Kanda, T., Ohmiya, K., Ebisu, T., Kono, M. (1989): Purification and characterization of macrolide 2'-phosphotransferase from a strain *E. coli* that is highly resistance to erythromycin. Antimicrob Agents Chemother. 33:1354-1357.

Petráš, P. (2010): Nový „český“ stafylokok, *Staphylococcus microti*. Zprávy CEM – SZÚ, Praha. 19: 37 - 39.

- Pinkett, H. W., Lee, A. T., Lum, P., Locher, K. P. & Rees, D. C. (2007): An inward-facing conformation of a putative metal-chelate type ABC transporter. *Science*. 315: 373–377.
- Qin, X., Poon, B., Kwong, J., Niles, D., Schmidt, Z.B., Rajagopal, L., Gantt, S. (2011): Two paediatric cases of skin and soft-tissue infections due to clindamycin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying a plasmid-encoded *vga(A)* allelic variant for a putative efflux pump. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 38: 81-83.
- Rees, C. D., Johnson, E., Lewinson, O. (2009): ABC transporters: the power to change. *Molecular cell Biology*. 10:218-227.
- Retsema, J., Fu, W. (2001): Macrolides: structures and microbial targets. *Int J Antimicrob Agents* 18:S3-S10.
- Reynolds, E., J. I. Ross, and J. H. Cove. (2003): Msr(A) and related macrolide/streptogramin resistance determinants: incomplete transporters? *Int. J. Antimicrob. Agents* 22:228–236.
- Reynolds, E. D., and J. H. Cove. (2005): Resistance to telithromycin is conferred by *msr(A)*, *msrC* and *msr(D)* in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 56:1179-80.
- Ross, J. I., Eady, E. A., Cove, J. H., Cunliffe, W. J., Baumberg, S. and Wootton, J. C. (1990): Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. *Mol Microbiol*. 4: 1207 – 1214.
- Ross, J. I., Eady, E. A., Cove, J. H., Baumberg, S. (1996): Minimal functional system required for expression of erythromycin resistance by *msrA* in *Staphylococcus aureus* RN4220. *Gene*. 183:143-8.
- Senior, A. E., M. K. Al-Shawi, and I. L. Urbatsch. (1995): The catalytic cycle of P-glycoprotein. *FEBS Lett*. 377:285–289.

Schoner, B., Geistlich, M., Rosteck, P., Rao, R. N. Jr., Seno, E., Reynolds, P., Cox, K., Burgett, S., Hershberger, C. (1992): Sequence similarity between macrolide-resistance determinants and ATP-binding transport proteins. *Gene* 115:93–96.

Singh, K. V., Malathum, K., Murray, B.E. (2001): Disruption of an *Enterococcus faecium* species-specific gene, a homologue of acquired macrolide resistance genes of staphylococci, is associated with an increase in macrolide susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 45:263-6.

Singh, K. V., Weinstock, G. M., Murray, B.E. (2002): An *Enterococcus faecalis* ABC homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfopristin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:1845–1850.

Tenson T., Xiong L. Kloss O., Mankins A.S. (1997): Erythromycin resistance peptides selected from random peptide libraries. *J Biol Chem.* 272: 17425-17430.

Tenson, T., Lovmar, M. and Ehrenberg, M. (2003): The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *J Mol Biol.* 330: 1005 – 1014.

Urbášková, P. Rezistence bakterií k antibiotikům-vybrané metody. Trios, Praha.

Urbatsch, I. L., Sankaran, B., Bhagat, S., Senior, A.E. (1995): Both P-glycoprotein nucleotide-binding sites are catalytically active. *J. Biol. Chem.* 270:26956–26962.

Vannuffel, P., Cocito, C. (1996): Mechanism of action of streptogramins and macrolides. *Drugs* 51 Suppl 1:20-30.

Vasiliou V., Konstandinos Vasiliou K., Nebert D.W. (2009): Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family, *Hum. Genomics*, 3:281-290.

Vazquez de Aldana, C. R., Marton, M.J., Hinnebusch, A.G. (1995): GCN20, a novel ATP binding cassette protein, and GCN1 reside in a complex that mediates activation of the eIF-2 alpha kinase GCN2 in amino acid-starved cells. *EMBO J.* 14:3184–3199.

Verhoef, J., et al. (1971): Lysogeny in coagulase-negative staphylococci. J Med Microbiol. 4: 405 – 412.

Versalovic, J., Shortridge, D., Kibler, K., et al. (1996): Mutations in 23S rRNA are associated with erythromycin resistance in *Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother. 40:477-480.

Vester, B., Douthwaite, S. (2001): Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. Antimicrob Agents Chemother 45: 1–12.

Von Eiff, C., Peters, G. and Heilmann, C. (2002): Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. Lancet Infect Dis. 2: 677 – 685.

Votava M. (2001): Lékařská mikrobiologie obecná. Neptun, Brno, 163-165,170-182.

Votava M. (2003): Lékařská mikrobiologie speciální. Neptun, Brno, 99-106.

Weisblum, B. (1995): Erythromycin resistance by ribosome modification, Antimicrob. Agents Chemother, 39:577-585.

Wondrack L., Massa M., Yang, B.V., Parisi, J.T. (1996): Clinical strain of *Staphylococcus aureus* inactivates and causes efflux of macrolides. Antimicrob Agents Chemother. 40: 992-998.

Yarunin, A., Panse, V. G., Petfalski, E., Dez, C., Tollervey, D., Hurt, E. C. (2005): Functional link between ribosome formation and biogenesis of iron-sulfur proteins. EMBO J. 24:580–588

Zhang, H.Z., Schmidt, H., Piepersberg, W. (1992): Molecular cloning and characterization of two lincomycin-resistance genes, *lmrA* and *lmrB*, from *Streptomyces lincolnensis* 78-11. Mol Microbiol, 6(15):2147-2157.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/154?subset=>